



REC'D 29 OCT 2004

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 JUL. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE
PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE
17.1. a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

REMISE DES PIÈCES DATE 25 JUL 2003 INPI PARIS LIEU 0308158 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 25 JUL. 2003		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet SUEUR & L'HELGOUALCH 109, boulevard Haussmann 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) B0557FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date ____/____/____ N° _____ Date ____/____/____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Complexes de lanthanide, leur préparation et leurs utilisations.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public à caractère Scientifique et Technique	
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Adresse	Rue	3, rue Michel Ange	
	Code postal et ville	75016	PARIS
Pays		FR	
Nationalité		FR	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 25 JUL 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Révisé à l'INPI 0309158	
Vos références pour ce dossier : (facultatif)		B0557FR	
6 MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		Cabinet SUEUR & L'HELGOUALCH	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	109, boulevard Haussmann	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone (facultatif)		01.53.30.26.30	
N° de télécopie (facultatif)		01.53.30.26.39	
Adresse électronique (facultatif)		sueur@cabinet-sueur.fr	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Païement échelonné de la redevance		Païement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Yvette SUEUR CPI 92-1232		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS		LIEU 0309158	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire DB 829 W / 260899	
Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0557FR	
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation	
		Date / / N°	
		Pays ou organisation	
		Date / / N°	
		Pays ou organisation	
		Date / / N°	
5 DEMANDEUR			
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public à caractère Scientifique, Culturel et Professionnel	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	4, rue Blaise Pascal	
	Code postal et ville	67000	STRASBOURG
Pays		FR	
Nationalité		FR	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
5 DEMANDEUR			
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Pays			
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Yvette SUEUR CPI 92-1232	
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

La présente invention concerne des composés capables de former des complexes avec les lanthanides, les complexes obtenus et leurs utilisations.

Les marqueurs radioactifs ont été largement utilisés dans le domaine de l'imagerie médicale et de l'immunologie. En raison des inconvénients qu'ils présentent, ils ont été remplacés en grande partie par des marqueurs fluorescents.

Cependant l'utilisation des marqueurs fluorescents présente quelques inconvénients, notamment dus à l'auto-fluorescence des milieux biologiques étudiés et à la diffusion de lumière dans les appareillages. Les complexes d'ions lanthanides ont été proposés pour permettre une acquisition en temps résolu qui supprime ces inconvénients. Pour être utilisé comme marqueur luminescent en temps résolu, un complexe d'ion lanthanide doit présenter de nombreuses caractéristi-

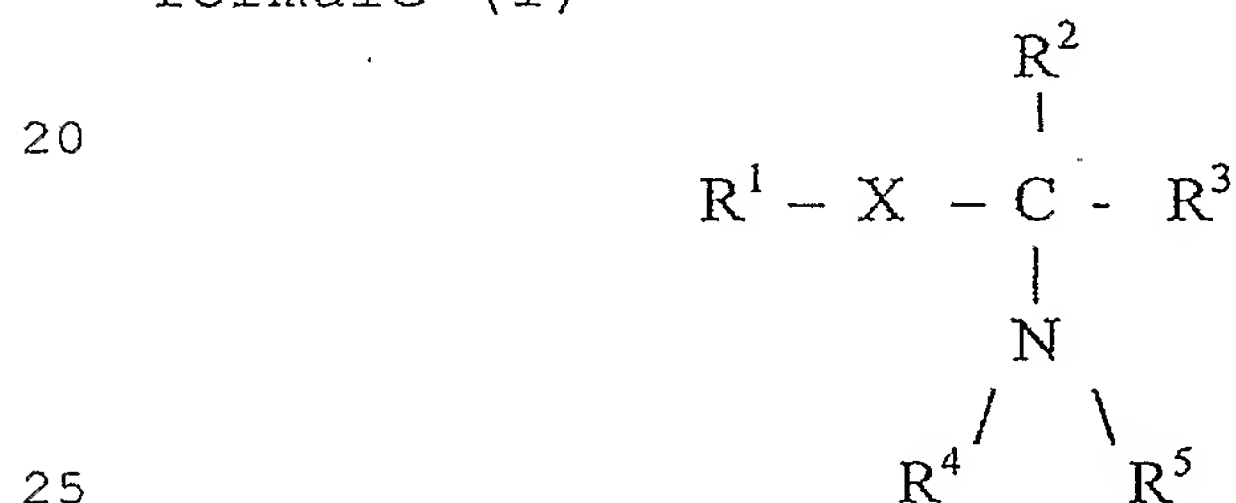
ques, parmi lesquelles les plus importantes sont l'hydrophilicité, la stabilité dans l'eau, la présence de chromophores capables de générer l'effet d'antenne (Sabbatini, N. et al. Coord. Chem. Rev. 1990, 123, 201), de bonnes propriétés photo-physiques (absorption élevée, excitation dans une gamme énergétique facilement accessible, temps de vie de l'état excité élevé et rendement quantique de luminescence élevé) et une fonction réactive qui permet un greffage covalent.

Les composés actuellement proposés possèdent rarement la totalité de ces critères. Par exemple, les premiers complexes développés par la firme Wallac Oy sous l'appellation Delfia Chelate (Hemmilä, I. et al. Anal. Biochem. 1984, 137, 335) ne possèdent pas de bonnes propriétés photo-physiques et il est nécessaire de procéder à une étape d'extraction du lanthanide pour mesurer sa luminescence. Les composés développés par CIS Bio international sont des cryptates qui nécessitent l'utilisation d'anions fluorures pour augmenter la luminescence (Hemmilä, I. et al. Drug Discovery Today, 1997, 2, 373). La stabilité des composés pose également de graves problèmes. Ainsi les composés développés par CyberFluor sous le nom de BCPDA ne forment des complexes stables luminescents qu'à fortes concentrations (Marriott, G. et al., Biophysical Journal, 1994, 67, 957).

Des complexes de lanthanide, notamment de gadolinium, ont été utilisés comme agent de relaxation ou de contraste pour l'imagerie médicale par RMN (Caravan, P. et al. Chem. Rev. 1999, 99, 2293). Cette utilisation est permise par le fait que la première sphère de coordination du lanthanide n'est pas complètement saturée par le ligand en solution aqueuse, des molécules d'eau pouvant alors compléter la sphère de coordination.

Le but de la présente invention est de proposer des complexes de lanthanide qui présentent des propriétés améliorées par rapport aux complexes de lanthanide de l'art antérieur. C'est pourquoi l'invention a pour objet de nouveaux composés, leur utilisation pour la préparation de complexes avec des ions lanthanides, ainsi que l'utilisation des complexes obtenus comme marqueurs fluorescents, comme agents de relaxation pour la RMN, ou pour l'imagerie RMN.

Un composé selon la présente invention répond à la formule (I)



dans laquelle

- R^1 est un groupe fonctionnel ;
- X représente une simple liaison ou une chaîne hydrocarbonée constituée par au moins un groupe choisi parmi les groupes alkylènes et les groupes alkénylènes qui comprennent éventuellement au moins un hétéroatome, et parmi les groupes arylènes ;
- R^2 est un groupement anionique à pH neutre A^2 ou un groupe alkylène ou alkénylène ayant de 1 à 4 atomes de carbone et portant au moins un tel groupement A^2 , ledit groupe alkylène ou alkénylène comprenant éventuellement au moins un hétéroatome dans la chaîne ;
- R^3 représente H ou un groupe alkylène ou alkénylène ayant de 1 à 5 atomes de carbone et contenant

éventuellement au moins un hétéroatome dans la chaîne, ledit groupe portant éventuellement au moins un groupement anionique à pH neutre A^3 ;

- R^4 est un substituant qui a des propriétés d'absorption de lumière et qui permet de former trois cycles chélates avec un lanthanide ;

- R^5 est un substituant qui permet de former trois cycles chélates avec un lanthanide.

Par groupe arylène; on entend dans le présent texte, un groupe comprenant un noyau aromatique unique ou plusieurs noyaux aromatiques condensés ou non, le(s)dit(s) noyau(x) portant éventuellement un ou plusieurs groupements hydrocarbonés aliphatiques.

L'hétéroatome des substituants X , R^2 et R^3 peut être notamment O ou N.

Le substituant R^1 est de préférence un groupe capable de
réagir avec les fonctions présentes sur les protéines, les anti-corps ou sur des matériaux minéraux ou organiques. A titre d'exemple, on peut citer les groupes amino, thio, cyano, isocyano, acridine, hydrazino, halogénoacétate, anhydride, triazo, carbonyle, nitrobenzoyle, sulfonyle, thionyle, halogénure, époxyde, aldéhyde, imidazole, phénol, mercapto, succinimido, maléimido, hydroxyle, carboxyle, thiocyno, isothiocyano. Les groupes amino, thio, carboxyle, maléimido, succinimido et isothiocyano sont particulièrement préférés.

Lorsque le groupement X est un groupement alkylène ou alkénylène, il a de préférence de 1 à 10 atomes de carbone. Lorsque X est un groupement arylène, il a de préférence de 5 à 10 atomes de carbone. A titre d'exemple de groupes arylènes, on peut citer les groupes $-C_6H_4-$, $-CH_2-C_6H_4-CH_2-$, $-C_6H_4-CH_2-$, $-C_6H_4-CH_2-C_6H_4-$, $-C_6H_3(CH_3)-$. X est avantageusement choisi parmi une liaison simple ou un groupement alkylène ou alkénylène ayant 2 ou 3 atomes de carbone.

Le substituant R^2 est de préférence un groupe A^2 .

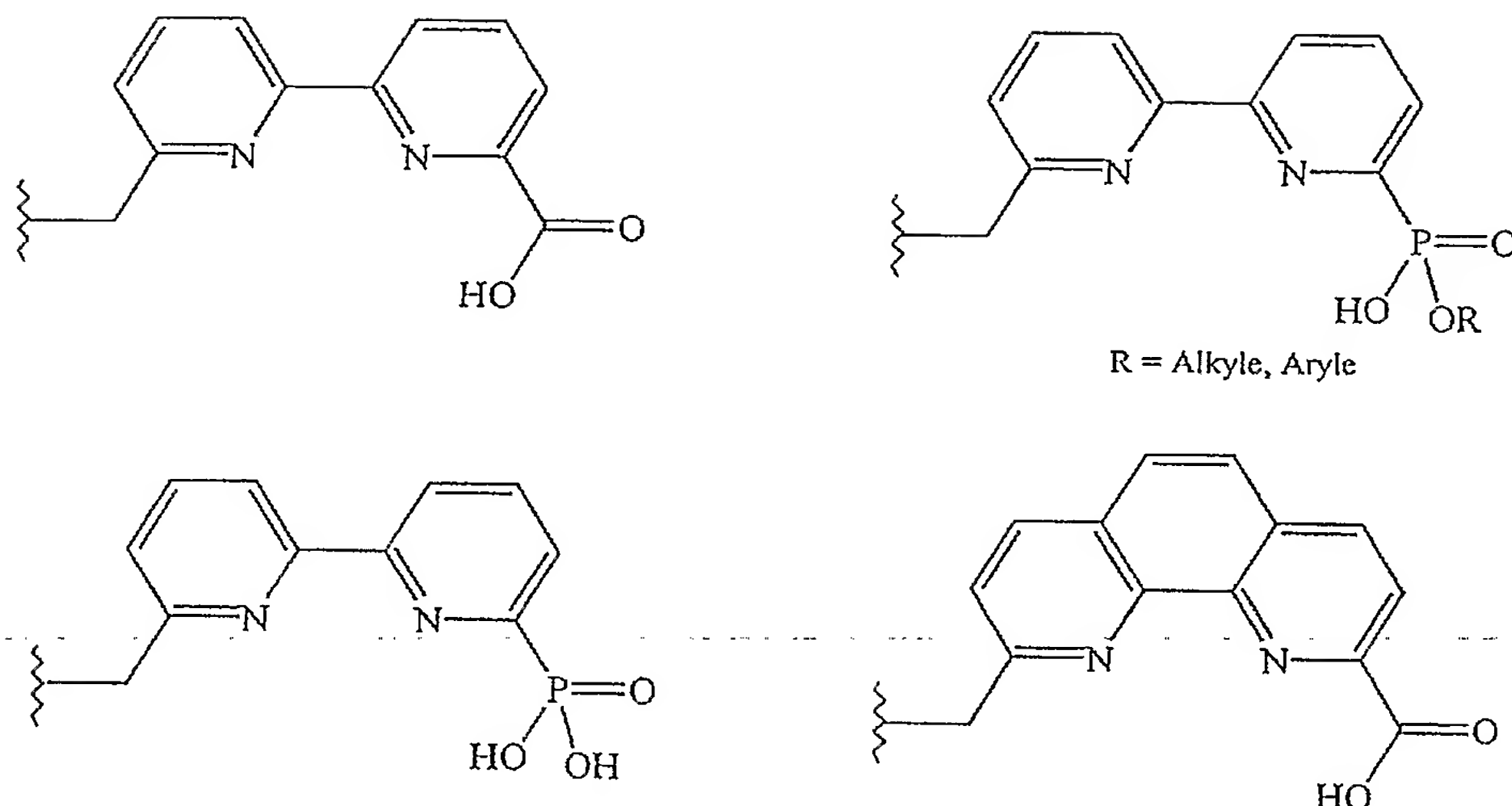
Le substituant R^3 est de préférence H ou un alkyle en C_1 à C_3 .

Le substituant R^4 est avantageusement un groupement répondant à la formule $-(C)_n-C-Z^1-C-C-Z^2-C-A^4$ dans laquelle n

est égal à 1 ou 2, chaque Z^1 représente un hétéroatome choisi parmi O et N, l'un au moins des Z^1 étant un atome d'azote qui fait partie d'un hétérocycle aromatique avec les deux atomes de carbone qui l'entourent, et A^4 est un groupe
5 anionique à pH neutre tel que l'atome portant la charge anionique est en position γ par rapport à Z^2 . Parmi ces substituants R^4 particuliers, ceux dans lesquels Z^1 et Z^2 font partie d'un groupe hétérocyclique aromatique sont particulièrement intéressants. Les substituants R^4 dans
10 lesquels n est égal à 1 sont préférés.

Comme exemple de substituant R^4 dans lequel l'un des Z^1 est un atome d'azote qui fait partie d'un hétérocycle aromatique, on peut citer les substituants dans lesquels l'un des segments $-C-Z^1-C-$ fait partie d'un groupe
15 hétérocyclique choisi parmi les groupes pyridyle, pyrimidinyle, quinolyne et iso-quinolyne.

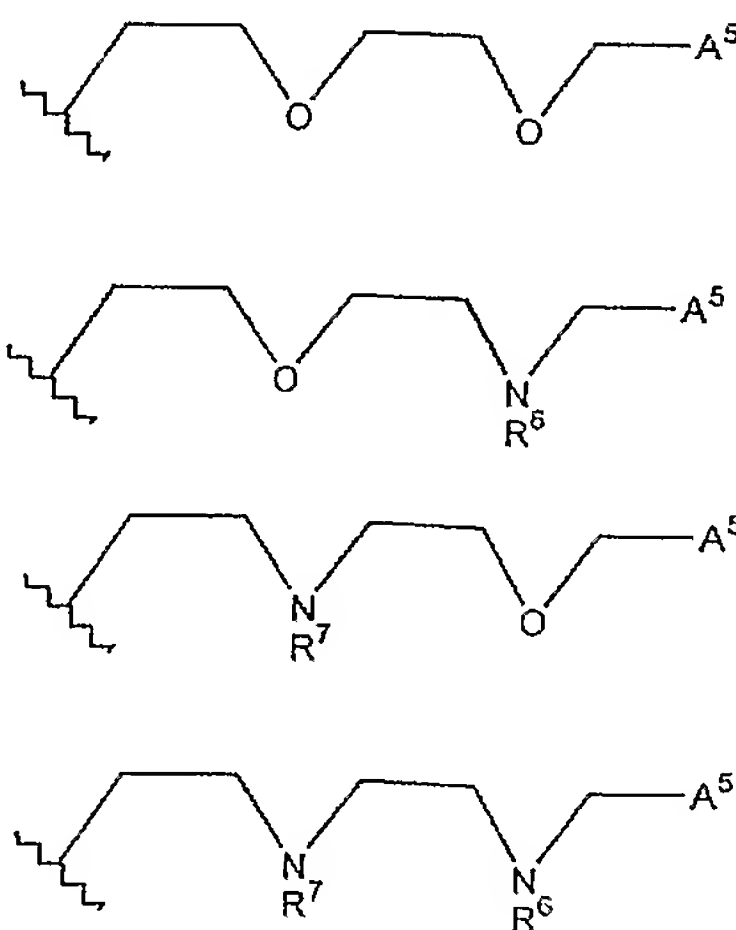
Comme exemple de substituant R^4 dans lequel Z^1 et Z^2 font partie d'un groupe hétérocyclique aromatique, on peut citer les substituants dans lesquels chacun des segments
20 $-C-Z^1-C-$ fait partie d'un groupe hétérocyclique choisi parmi les groupes pyridyle, pyrimidinyle, quinolyne et iso-quinolyne, les deux groupes hétérocycliques étant reliés au moins par les deux atomes de carbone séparant Z^1 et Z^2 . A titre d'exemples de tels segments $-C-Z^1-C-C-Z^2-C-$, on peut
25 citer les groupes 2,2'-bipyridinyle, 1,10-phénanthrolinyle, 2,2'-bisquinolyne, 2,2'-bisisoquinolyne et 2,2'-bipyrimidinyle. Les formules ci-dessous représentent respectivement un groupe 2,2'-bipyridyle portant un carboxyle, un monoalkylphosphonate, un monoarylphosphonate et un phosphonyle, ou
30 un groupe phénanthrolinyle portant un groupe carboxyle.



Le substituant R^5 peut être choisi parmi :

- les groupements définis pour R^4 ;
- les chaînes hydrocarbonées $-C-C-E^1-C-C-E^2-C-A^5$ dans lesquelles E^1 et E^2 représentent indépendamment l'un de

l'autre un hétéroatome choisi parmi O et N, et A^5 est un groupe anionique à pH neutre tel que l'atome portant la charge anionique est en position γ par rapport à E^2 . A titre d'exemple, on peut citer les groupements suivants :



10

dans lesquels R^6 et R^7 représentent des chaînes alkyles ayant de préférence de 1 à 5 atomes de carbone et contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes. Les composés dans lesquels R^4 et R^5 sont identiques sont particulièrement
15 préférés.

Dans un composé de l'invention, les groupes anioniques à pH neutre A^2 , A^3 , A^4 ou A^5 peuvent être choisis indépendam-

ment les uns des autres parmi les groupes $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR})\text{OH}$ et $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ dans lesquels R est un groupe alkyle (de préférence en C_1 à C_3) ou un groupe aryle (de préférence en C_5 à C_9). Suivant le pH du milieu réactionnel, les composés (I) sont obtenus sous forme cationique, zwitterionique ou anionique. En milieu acide, l'azote porteur des substituants R^4 et R^5 , ainsi qu'éventuellement les hétéroatomes Z^1 , Z^2 , E^1 et E^2 se trouvent sous forme protonée et le composé est sous forme cationique. En milieu basique, les différents groupes A^1 se présentent sous forme de sel et le composé est sous forme anionique. A des pH intermédiaires, le composé se présente sous forme zwitterionique.

Un complexe selon la présente invention est constitué par un ion lanthanide Ln complexé par un ligand qui répond à la formule (I) ci-dessus. L'ion lanthanide est choisi parmi les ions europium, terbium, samarium, dysprosium, erbium, ytterbium, néodyme et gadolinium. On utilisera de préférence l'euporium, le terbium, le samarium ou le dysprosium si le complexe est destiné à être utilisé pour le marquage par fluorescence, et l'euporium, le dysprosium ou le gadolinium lorsque le complexe est destiné à être utilisé comme agent de contraste pour l'IRMN.

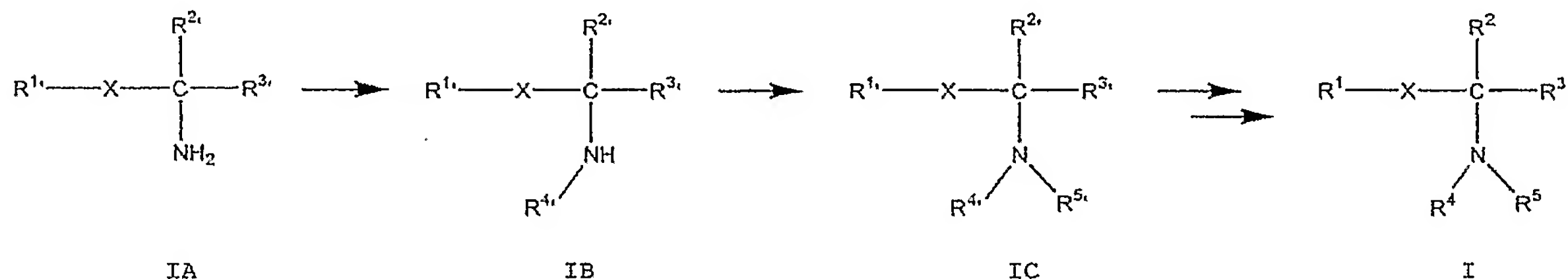
Dans un complexe selon l'invention dans lequel R^4 est $-\text{C}-\text{C}-\text{Z}^1-\text{C}-\text{C}-\text{Z}^2-\text{C}-\text{A}^4$, les 3 cycles chélates se forment entre le cation lanthanide et respectivement :

- l'atome N portant R^4 et R^5 , Z^1 et les atomes de carbone qui les séparent ;
- Z^1 , Z^2 et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- le segment terminal $\text{Z}^2-\text{C}-\text{A}^4$.

Lorsque R^5 est du même type que R^4 , il forme avec l'ion lanthanide des chélates du même type que ceux formés par R^4 . Lorsque R^5 est du type $-\text{C}-\text{C}-\text{E}^1-\text{C}-\text{C}-\text{E}^2-\text{C}-\text{A}^5$, 3 cycles chélates à 5 membres se forment entre le cation lanthanide et respectivement :

- l'atome N portant R^4 et R^5 , E^1 et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- E^1 , E^2 et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- le segment terminal $\text{E}^2-\text{C}-\text{A}^5$.

Un composé (I) peut être obtenu par des procédés bien connus de l'homme de métier à partir de produits commerciaux ou décrits dans la littérature par le schéma suivant :



5 dans lequel X, R¹, R², R³, R⁴ et R⁵ ont la signification donnée précédemment, et R^{1'}, R^{2'}, R^{3'}, R^{4'} et R^{5'} représentent des groupements précurseurs de R¹, R², R³, R⁴ et R⁵ respectivement.

Au cours des deux premières étapes, on introduit
 10 successivement les groupements R₄' et R₅' sur une molécule IA contenant X et les groupes R₁', R₂' et R₃' pour obtenir le composé IC.

Au cours d'étapes ultérieures, on transforme les groupes R^{1'}, R^{2'}, R^{3'}, R^{4'} et R^{5'} du composé IC respectivement
 15 en groupes R¹, R², R³, R⁴ et R⁵.

Lorsque les groupements R^{4'} et R^{5'} sont identiques en vue d'obtenir des groupements R⁴ et R⁵ identiques, ils sont introduits simultanément au cours de la première étape. Lorsqu'ils sont différents, ils sont introduits dans un
 20 ordre indifférent par réaction de la molécule IA successivement avec deux réactifs différents.

Lorsque le composé (I) est un composé dans lequel :

- les groupements R¹ et R² sont des fonctions carboxyles,
- le groupement R³ est un atome d'hydrogène et
- 25 - le groupement X est une simple liaison, un groupe méthylène ou un groupe éthylène,

on choisira avantageusement et respectivement comme produit de départ IA respectivement le diester éthylique de l'acide aminomalonique, le diester méthylique de l'acide aspartique
 30 et le diester méthylique de l'acide glutamique, qui sont des produits disponibles dans le commerce.

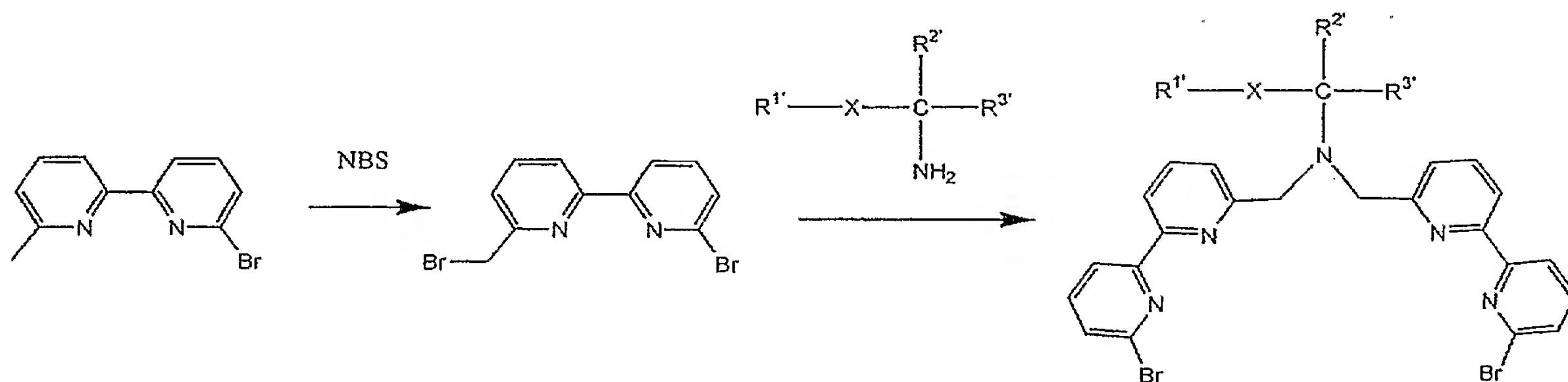
Lorsque le composé (I) est un composé dans lequel :

- les groupements R¹ et R² sont des fonctions carboxyles,

- le groupement R^3 est un atome d'hydrogène et
- le groupement X est un propylène ou un benzène parasubstitué,

on peut utiliser comme produit de départ IA respectivement
 5 le diester méthylique de l'acide 2-amino-adipique (dont la
 préparation est décrite par Lerch, E. et al, Helv. Chim.
 Acta, 1974, 57, 1584) et l'ester méthylique de l'acide (α -
 amino-4-methoxycarbonyl)benzène acétique (dont la prépara-
 tion est décrite par Chauvel, E. et al, J. Med. Chem. 1994,
 10 37, 1339).

Lorsque les groupements R^4 et R^5 sont identiques et
 leurs segments $-C-C-Z^1-C-C-Z^2-C-$ sont dérivés de la 2,2'-
 bipyridine, on fait réagir le produit de départ au cours de
 la première étape, avec la 6-bromométhyl-6'-bromo-2,2'-
 15 bipyridine pour obtenir un composé dibromé IC. La 6-
 bromométhyl-6'-bromo-2,2'-bipyridine peut être obtenue par
 une réaction de bromation radicalaire de la 6-méthyl-6'-
 bromo-2,2'-bipyridine par la N-bromo-succinimide dans le
 benzène, la 6-méthyl-6'-bromo-2,2'-bipyridine étant obtenue
 20 selon la méthode décrite par Houghton M. et al, J. Chem.
 Soc., Dalton Trans. 1997, 2725. Le schéma réactionnel de la
 première étape de ce cas particulier est donné ci-après.



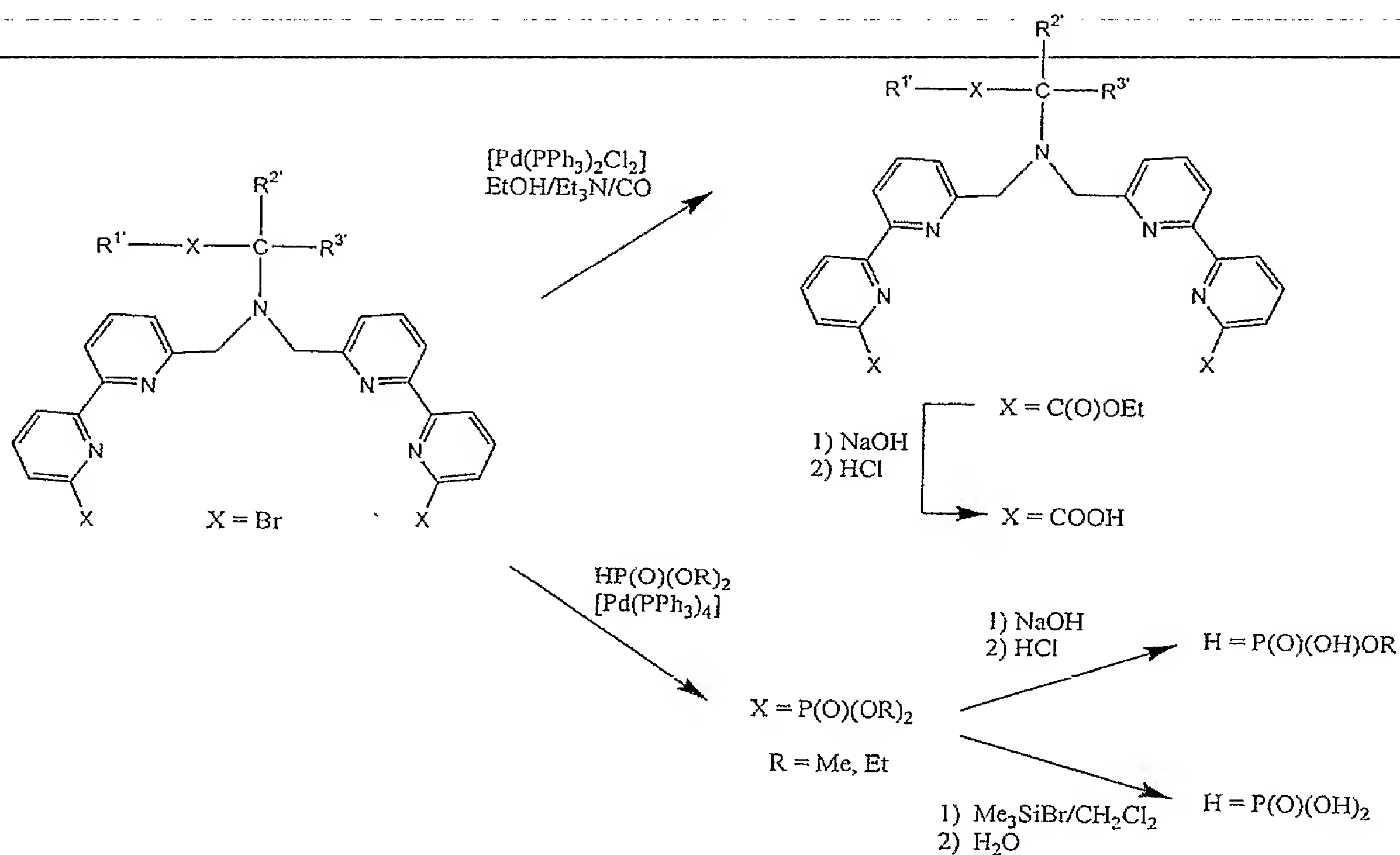
Lorsque le composé dibromé IC est soumis à une
 25 carboalkoxylation, suivie d'une saponification avec NaOH et
 d'une acidification avec HCl, on obtient un composé (I) dans
 lequel les groupements A^4 et A^5 sont des groupes carboxyles.
 La carboalkoxylation peut être effectuée suivant le procédé
 décrit par El-Ghayoury et al, J. Org. Chem., 2000, 65, 7757.

30 Lorsqu'on fait réagir le composé dibromé IC avec le
 dialkylphosphite (selon la méthode décrite par Penicaud et
 al, Tetrahedron Lett. 1998, 39, 3689), on obtient le

dialkylester de l'acide phosphonique, chaque atome de brome étant remplacé par un groupe $P(O)(OR)_2$. Le dialkylester de l'acide phosphonique donne, par une saponification avec NaOH dans l'eau, suivie d'une acidification avec HCl, un composé (I) dans lequel les groupements A^4 et A^5 sont des groupements $P(O)(OH)OR$.

Par réaction du dialkylester de l'acide phosphonique $P(O)(OR)_2$ avec le bromure de triméthylsilyle suivie d'une hydrolyse (selon la méthode décrite par McKenna C. et al., 10 Tetrahedron Lett, 1977, 18, 155), on obtient un composé (I) dans lequel les deux groupes anioniques A^4 et A^5 sont des groupements $P(O)(OH)_2$.

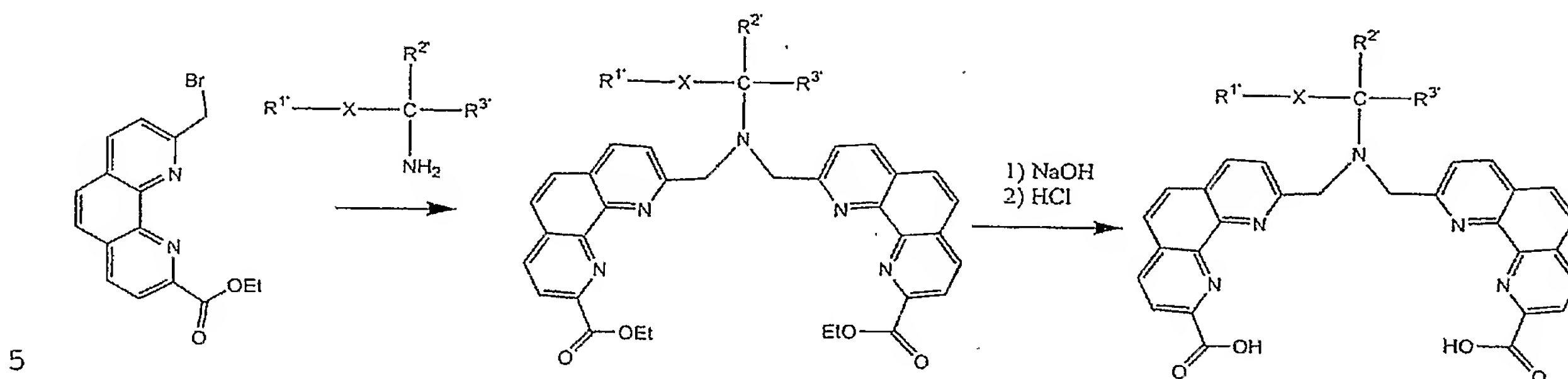
Le schéma réactionnel des trois modes de mise en œuvre ci-dessus est donné ci-après.



15

Lorsque les groupements R^4 et R^5 sont identiques et leurs segments $-C-C-Z^1-C-C-Z^2-C-$ sont dérivés de la 1,10-phénantroline, on fait réagir le produit de départ au cours de la première étape avec la 2-bromométhyl-9-éthoxycarbonyl-1,10-phénantroline. La préparation de la 2-bromométhyl-9-éthoxycarbonyl-1,10-phénantroline est décrite par Ulrich G. et al, (Tetrahedron Lett. 2001, 42, 6113). En soumettant le

composé diester obtenu, à une saponification avec NaOH, suivie d'une acidification avec HCl dilué, on obtient un composé (I) dans lequel les groupements A⁴ et A⁵ sont des carboxyles. Le schéma réactionnel est donné ci-après.



Un substituant R¹ souhaité peut être obtenu en choisissant soit un composé de départ qui le porte, soit un composé de départ qui porte un précurseur R^{1'} du substituant souhaité. Lorsqu'un substituant R¹ est obtenu à partir d'un précurseur R^{1'}, la formation du substituant souhaité peut se faire sur un composé de formule (IC) contenant le précurseur ou sur un complexe formé avec un cation lanthanide et un composé de formule (I) contenant le précurseur.

Un substituant R¹ du type carboxyle peut être obtenu par une réaction de saponification à partir d'un groupe précurseur R^{1'} contenant une fonction ester carboxylique. Un substituant R¹ du type amino peut être obtenu à partir de la réduction d'un groupe précurseur R^{1'} contenant une fonction nitro. Un substituant R¹ du type isothiocyano peut être obtenu par réaction d'un précurseur R^{1'} contenant une fonction amino avec le thiophosgène. Un substituant R¹ du type maléimido peut être obtenu par réaction d'un précurseur R^{1'} contenant une fonction amino avec l'ester N-succinimidique de l'acide 4-maléimidobutyrique.

Un substituant R¹ du type succinimido peut être obtenu à partir d'un complexe par activation d'un précurseur carboxyle avec de la N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide suivie d'une réaction avec la N-hydroxy-succinimide.

Un complexe selon l'invention peut être obtenu par réaction d'un composé donneur de cation lanthanide avec un composé de formule I. Comme exemple de composés donneurs de cation lanthanide, on peut citer les halogénures de

lanthanide hydratés, les nitrates de lanthanide hydratés, les carbonates de lanthanide et les triflates de lanthanide. La réaction est effectuée en solution dans un solvant. Le solvant est choisi de préférence parmi l'eau, le méthanol, l'éthanol ou l'acétonitrile.

Dans un mode de réalisation préféré, on fait réagir le composé (I) avec le précurseur de l'ion lanthanide dans un mélange de méthanol et d'eau à un pH allant de 3 à 5, pendant une durée comprise entre 10 minutes et 24 heures, à une température comprise entre 25°C à 80°C. Ensuite, le pH de la solution est porté à 7,0 et le méthanol est évaporé avant d'isoler le complexe formé.

Les complexes de la présente invention peuvent être utilisés notamment pour le marquage par fluorescence ou pour l'imagerie par résonnance magnétique nucléaire. Pour ces applications, ~~les groupes R¹ préférés sont les groupes~~ amino, thio et carboxyle (qui doivent être activés avant le couplage covalent avec la molécule à marquer), et les groupes maléimido, succinimido et isothiocyano (qui peuvent se lier directement avec la molécule à marquer).

Les complexes de la présente invention sont utiles pour des analyses ou des dosages de composés par marquage des composés. Le procédé consiste à lier de manière covalente au composé à doser, un marqueur constitué par un complexe selon l'invention, et à détecter ou quantifier la présence du composé marqué grâce aux propriétés de luminescence du marqueur. Les complexes d'euprimum, de terbium, de samarium ou de dysprosium sont particulièrement préférés pour cette application.

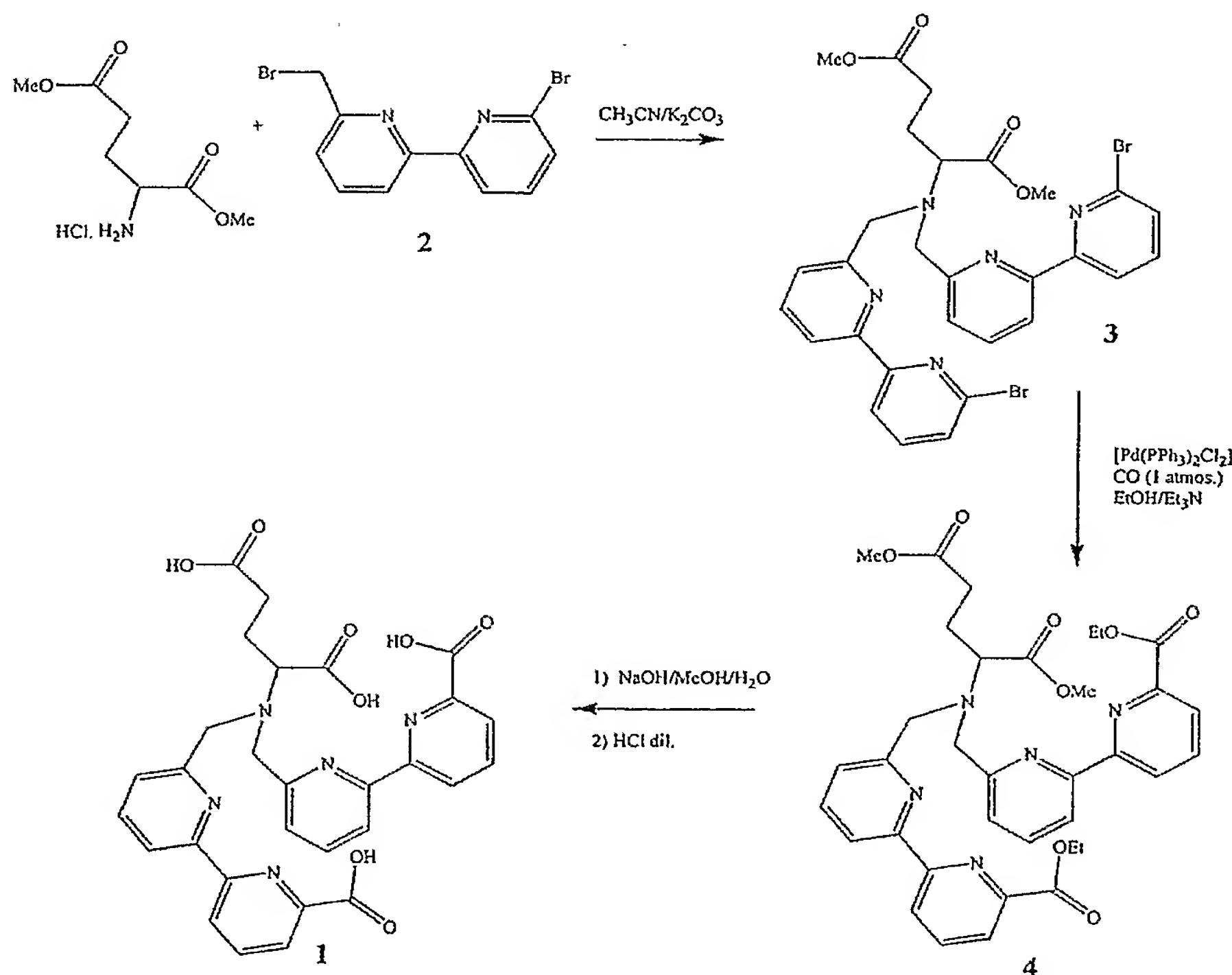
Lorsque les complexes d'ions lanthanides selon l'invention sont destinés à être utilisés comme agent de relaxation pour la résonnance magnétique nucléaire, on utilise de préférence des complexes du gadolinium, d'euprimum ou de dysprosium.

La présente invention sera décrite plus en détail par les exemples donnés ci-après à titre d'illustration, auxquels elle n'est cependant pas limitée.

Exemple 1

Préparation du composé 1

Le composé 1 a été obtenu selon le schéma synthétique suivant. L'isomère (S) de l'ester glutamique choisi pourrait être remplacé par l'isomère (R) ou un mélange des deux isomères.



Préparation du composé 2

Dans un ballon de 250 mL, on introduit 1,5 g de 6-méthyl-6'-bromo-2,2'-bipyridine (6,0 mmol), 66 mg (0,4 mmol) d'azo-bis-isobutyronitrile (AIBN), et 1,3 g (7,3 mmol) de N-bromosuccinimide dans 90 mL de benzène. La solution est chauffée à reflux pendant 2h30 en l'irradiant avec une lampe halogène standard de 100 W. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu solide est chromatographié sur silice en utilisant un gradient de CH_2Cl_2 /hexane de 50/50 à 100/0. On obtient 940 mg (2,9 mmol) de composé 2 (correspondant à un rendement de 48%) qui présente les caractéristiques suivantes :

$R_f = 0,42$, SiO_2 , CH_2Cl_2 .

^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) : δ 4,61 (s, 2H), 7,48 (d, 1H, $J=7,5$ Hz), 7,50 (d, 1H, $J=7,5$ Hz), 7,68 (t, 2H, $J=8,0$ Hz), 7,83

(t, 1H, J=8,0 Hz), 8,33 (d, 1H, J=8,0 Hz), 8,44 (d, 1H, J=8,0 Hz).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 50 MHz) : δ 34,0, 120,1, 120,7, 124,0, 128,2, 138,1, 139,3, 141,6, 154,3, 156,4, 156,9.

5 Analyses calculées pour $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{Br}_2$: C 40,28, H 2,46, N 8,54. Trouvées : C 40,12, H 2,34, N 8,44.

FAB⁺/MS : 327 (50%), 329 (100%), 331 (50%) ($[2+\text{H}^+]$).

Préparation du composé 3

Dans un tube de Schlenk sous atmosphère d'argon, on
10 introduit 470 mg de sel d'hydrochlorure du diester
méthylique de l'acide L-glutamique (2,22 mmol) et 1,23 g de
 K_2CO_3 (8,90 mmol) dans 100 mL d'acétonitrile fraîchement
distillée sur P_2O_5 . La solution est chauffée à 80°C pendant
30 minutes. On ajoute 1,60 g (4,88 mmol) de composé 2 et on
15 chauffe pendant 23 heures à 80°C. La solution est évaporée à
~~sec, le résidu est redissous avec 100 mL de CH_2Cl_2 et 20 mL~~
d'eau. La phase aqueuse est lavée avec deux portions de 20
mL de CH_2Cl_2 et la somme des phases organiques est séchée sur
 MgSO_4 , filtrée, puis évaporée à sec. Le résidu solide est
20 soumis à une chromatographie flash sur silice ($\phi=5$ cm,
 $h=12$ cm) avec un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100/0 à 97/3) comme
éluant. On obtient 995 mg (1,49 mmol) de composé 3
(correspondant à un rendement de 67%) qui présente les
caractéristiques suivantes :

25 $R_f = 0,34$, SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98/2).

^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) : δ 2,06-2,20 (m, 2H), 2,39-2,68 (m,
2H), 3,50 (s, 3H), 3,54-3,62 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,99-
4,16 (m, 4H), 7,43-7,48 (m, 4H), 7,63 (t, 2H, $^3J=8,0$ Hz),
7,71 (t, 2H, $^3J=8,0$ Hz), 8,23 (d, 2H, $^3J=8,0$ Hz), 8,39 (d,
30 2H, $^3J=8,0$ Hz).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 50 MHz) : δ 24,8, 30,3, 51,5, 57,2, 62,1,
119,6, 119,7, 123,5, 127,8, 137,3, 139,1, 141,5, 153,8,
157,4, 159,1, 173,1, 173,4.

Analyses calculées pour $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4\text{Br}_2$: C 52,04, H 4,07, N
35 10,46. Trouvées : C 51,81, H 3,85, N 10,19.

FAB⁺/MS : 670,2 ($[3+\text{H}^+]$, 100%).

Préparation du composé 4

Dans un ballon bicol de 250 mL, on introduit 995 mg (1,49 mmol) de composé 3 et 150 mg (0,21 mmol) de [Pd(PPh₃)₂Cl₂] dans 50 mL d'éthanol et 50 mL de triéthylamine. La solution est chauffée à 70°C pendant 15 heures en faisant barboter un flux de CO. La solution est évaporée à sec, le solide obtenu est redissous dans 100 mL de CH₂Cl₂, filtré sur célite, puis la phase organique est extraite avec 20 mL d'eau. La phase aqueuse est lavée avec deux portions de 20 mL de CH₂Cl₂ et les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO₄, filtrées puis évaporées à sec. Le résidu est soumis à une chromatographie flash sur silice (ϕ =5 cm, h=10 cm) avec un mélange de CH₂Cl₂/MeOH (99/1 à 90/10) comme éluant. On obtient 588 mg (0,90 mmol) de 4 sous forme d'une huile légèrement orangée (correspondant à un rendement de 60%), qui présente les caractéristiques suivantes :

R_f = 0,30, SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH (95/5).

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz) : δ 1,46 (t, 6H, ³J= 7,0Hz), 2,06, 2,19 (m, 2H), 2,38-2,65 (m, 2H), 3,49 (s, 3H), 3,55-3,63 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 4,02-4,19 (m, 4H), 4,48 (q, 4H, ³J=7,0 Hz), 7,47 (d, 2H, ³J=8,0 Hz), 7,75 (t, 2H, ³J=8,0 Hz), 7,92 (t, 2H, ³J=8,0 Hz), 8,10 (d, 2H, ³J=8,0 Hz), 8,40 (d, 2H, ³J=8,0 Hz), 8,62 (d, 2H, ³J=8,0 Hz).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz) : δ 14,3, 24,8, 30,4, 51,5, 57,2, 61,8, 62,0, 119,9, 123,5, 124,2, 124,8, 137,3, 137,7, 147,8, 154,6, 156,5, 159,0, 165,4, 173,2, 173,5.

Analyses calculées pour C₃₅H₃₇N₅O₈ : C 64,11, H 5,69, N 10,68.

Trouvées : C 64,07, H 5,55, N 10,53.

FAB⁺/MS : 656,2 ([4+H⁺], 100%).

Préparation du composé 1

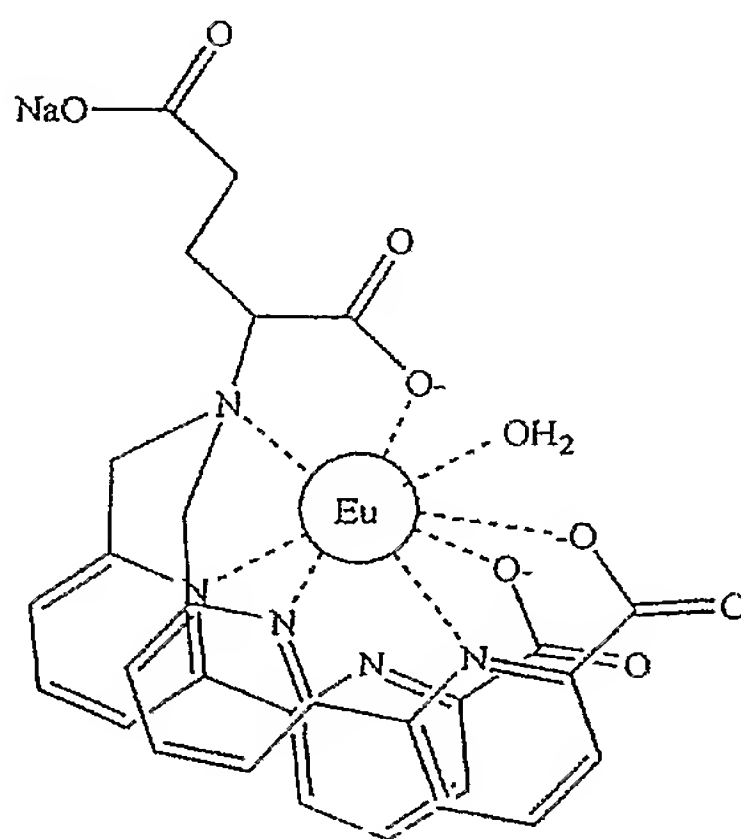
Dans un ballon équipé d'un réfrigérant, 588 mg (0,90 mmol) de 4 et 144 mg (3,60 mmol) de NaOH sont dissous dans un mélange de 50 mL de MeOH et 15 mL d'eau. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 5 heures. La solution est évaporée à sec et le solide est dissous dans 10 mL d'eau sur lesquels on ajoute lentement une solution d'HCl 2N jusqu'à pH = 2-3. Le précipité qui se forme est isolé par centrifugation et

séché sous vide. On obtient 411 mg (0,60 mmol) de composé 1 sous forme d'hydrochlorure 1.3HCl jaune pâle (correspondant à un rendement de 67%) dont les caractéristiques sont les suivantes :

- 5 ^1H -RMN (CD_3OD , 300 MHz) : δ 2,26-2,48 (m, 2H), 2,80-2,84 (m, 2H), 3,95-3,99 (m, 1H), 4,53-4,81 (m, 4H), 7,47 (d, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 7,63 (t, 2H, $^3J=8,0$ Hz), 7,90 (t, 2H, $^3J=8,0$ Hz), 8,02 (d, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 8,42 (d, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 8,58 (d, 2H, $^3J=7,5$ Hz).
- 10 ^{13}C -RMN (CD_3OD , 75 MHz) : δ 23,1, 32,1, 57,0, 67,0, 122,3, 125,1, 125,9, 126,1, 139,7, 140,1, 149,0, 154,1, 155,5, 156,1, 168,0, 173,7, 176,4.
- Analyses calculées pour $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_8 \cdot 3\text{HCl}$: C 51,15, H 4,14, N 10,28. Trouvées : C 51,01, H 4,43, N 9,95.
- 15 FAB $^+$ /MS : 572,5 ($[\text{1}+\text{H}^+]$, 100%).

Exemple 2

Préparation du complexe 5 de formule $[\text{Eu} \cdot (\text{1-4H}) \cdot \text{H}_2\text{O}] \text{Na}$



- 60 mg de 1.3HCl (88,1 μmol) sont dissous dans un mélange de 30 mL de MeOH et de 30 mL d'eau. A cette solution est ajouté un mélange de 36 mg (98,3 μmol) de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 3 mL de MeOH et 3 mL d'eau. La solution est chauffée à 70°C pendant 1 heure. Après refroidissement, le pH de la solution est remonté à 7,4 avec une solution à 5% de NaOH dans l'eau. La solution est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à apparition d'un léger trouble. Puis on ajoute du THF jusqu'à la formation d'un important précipité. Le précipité est isolé par centrifugation, puis
- 25

séché sous vide pour donner 62 mg (81,5 μmol) de composé 5, de formule $[\text{Eu}(\mathbf{1-4H})\cdot\text{H}_2\text{O}]\text{Na}$ sous forme de solide beige (rendement 93%) dont les caractéristiques sont les suivantes :

5 ^1H -RMN ($\text{D}_2\text{O}/t\text{-BuOH}$, 200 MHz, tous les signaux se présentent sous forme de singulets larges) : δ -9,40 (1H), -8,95 (1H), -4,23 (2H), -3,17 (1H), -2,21 (1H), 1,88 (1H), 2,73 (1H), 4,17 (1H), 6,06 (1H), 7,12 (1H), 7,80 (1H), 7,88 (1H), 8,90 (1H), 9,60 (1H), 9,89 (1H), 11,08 (1H), 11,38 (1H), 12,01
10 (1H).

IR (KBr, cm^{-1}) : 3420, 1619, 1574, 1460, 1384, 1274.

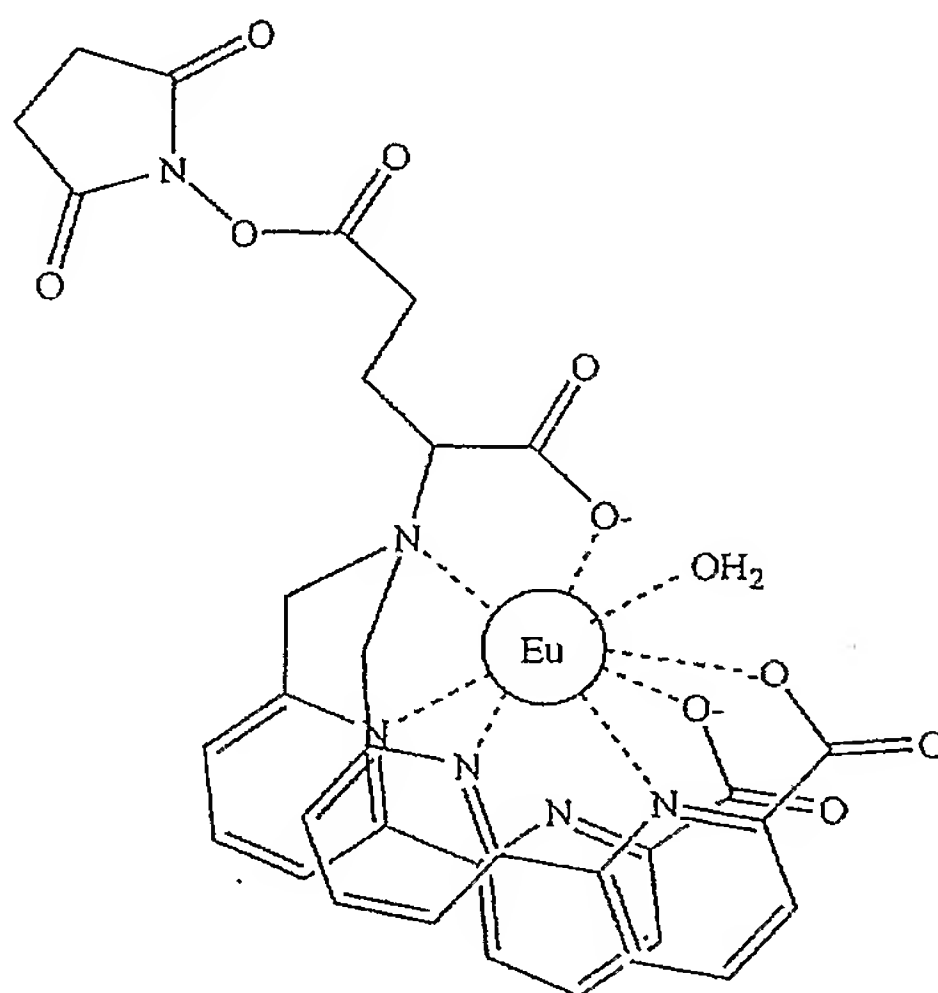
Propriétés photo-physiques dans l'eau:

Absorption, λ_{max} [nm] (ϵ_{max} [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) : 320 (épaulement), 308 (19700), 276 (8700), 267 (9700), 253 (14400).

15 Emission : caractéristique des composés de l'euprium avec des bandes fines à 581, 594, 615, 650 et 701 nm. Temps de vie de l'état excité : 0,62 ms. Rendement quantique (référence $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ dans l'eau) : 8%. Temps de vie de l'état excité dans l'eau lourde : 2,48 ms. Rendement
20 quantique dans l'eau lourde : 35%.

Exemple 3

Préparation du complexe 6 de formule :



40 mg (53 μmol) de complexe 5 et 12 mg (63 μmol) de
25 sels d'hydrochlorure d'éthyle-N,N-diméthyle-3-aminopropyle-carbodiimide (EDCI.HCl) sont mis en suspension dans 6 mL de

DMSO. A cette solution, on ajoute 7,0 mg (61 μmol) de N-hydroxysuccinimide. La solution est agitée à température ambiante pendant 66 heures, durant lesquelles le complexe 5 se dissout, puis un précipité blanc se forme. Le solide est isolé par centrifugation et séché sous vide à 50°C pendant 2 heures. On obtient 31 mg (37 μmol) de 6 (correspondant à un rendement de 71%) dont les caractéristiques sont les suivantes :

FAB⁺/MS : 817,1, 819,1 (6-H₂O, 6%), 720,1, 722,1 (6-H₂O-C₄H₄NO₃, 17%).

IR (pastille de KBr, cm⁻¹) : 3420, 1739, 1629, 1573, 1459, 1384.

Propriétés photo-physiques dans l'eau:

Absorption, λ_{max} [nm] (ϵ_{max} [M⁻¹.cm⁻¹]) : 320 (épaulement), 309 (20000), 276 (10000), 267 (10500), 253 (16000).

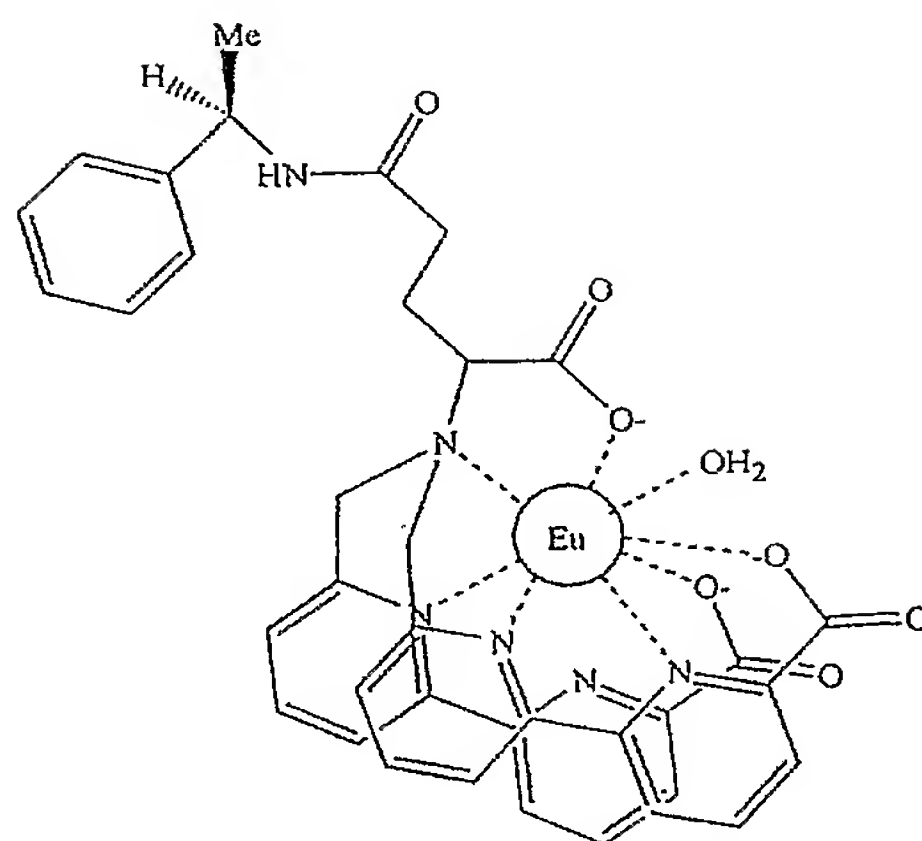
~~Emission: caractéristique des composés de l'euprium avec~~
des bandes fines à 581, 593, 615, 649 et 701 nm. Temps de vie de l'état excité : 0,63 ms. Rendement quantique (référence [Ru(bipy)₃]²⁺ dans l'eau) : 8%. Temps de vie de l'état excité dans l'eau lourde : 2,47 ms. Rendement quantique dans l'eau lourde : 34%.

Exemple 4

Marquage d'une amine par le complexe 5

10 mg de complexe 5 (13,1 μmol) sont mis en suspension dans 5 mL d'eau. On ajoute 3,5 mg (18,3 μmol) d'EDCI.HCl, puis 1,7 μL (13,2 μmol) de (+)- α -méthylbenzylamine. Après 15 minutes, puis une heure, on ajoute chaque fois 1,7 μL de (+)- α -méthylbenzylamine à température ambiante. L'agitation est poursuivie pendant 15 heures. La phase aqueuse est lavée avec 2 fois 10 mL de CH₂Cl₂, puis évaporée à sec, et l'on obtient 14 mg de solide jaune pâle. Après recristallisation avec un mélange MeOH/Et₂O, centrifugation et séchage sous vide, le complexe 7 (8,0 mg, 9,5 μmol) est récupéré sous forme de poudre crème (73%).

ISI-TOF/MS : 847,0513 (7-H₂O+Na⁺, 60 %), 825,0912 (7-H₂O+H⁺, 28%). La formule du complexe 7 est représentée ci-dessous.



Exemple 5

Marquage de l'albumine sérique de bœuf ASB par le complexe 6

Le complexe 6 (2,0 mg) est ajouté à une solution d'ASB (5,4 mg) dans 1 mL de tampon borate (50 mM dans l'eau, pH = 7,0) afin d'obtenir un rapport molaire 6/ASB de 30:1. La solution est agitée à température ambiante, conduisant à une dissolution complète de 6 après 2 heures. Après 24 heures d'agitation, la solution est déposée sur un filtre centrifuge (Centricon, Millipore, filtre à 30 KDa) et le volume de la solution est réduit à 200-300 μ L par filtration. La solution est diluée avec 3 mL d'eau, puis le volume est réduit de nouveau à 200-300 μ L par filtration. Cette dernière opération est répétée 3 à 4 fois, jusqu'à ce que les eaux de filtration ne soient plus luminescentes sous irradiation UV (absence d'euporium). Les 200-300 μ L de solution résiduelle contenant la protéine marquée et restant sur le filtre sont récupérés et stockés au frigidaire à 4°C.

Caractérisation de l'ASB marquée

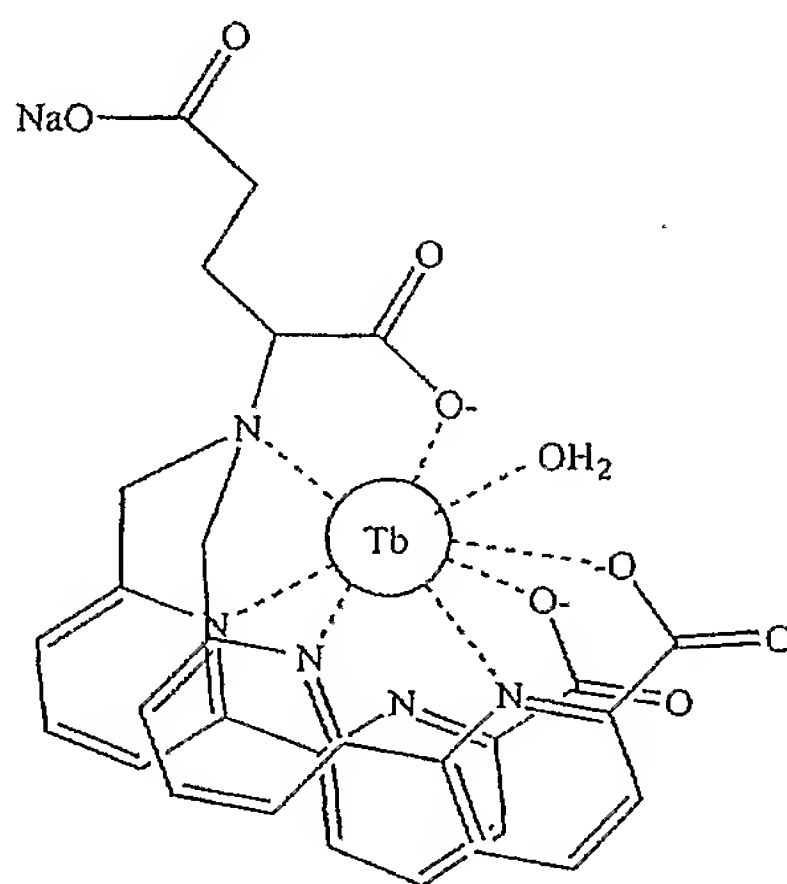
Le spectre d'absorption UV-Vis de la solution aqueuse d'ASB marquée montre une absorption intense due aux complexes d'euporium, qui recouvre en partie l'absorption due à la protéine ($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} = 38000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Par excitation de la solution dans la bande d'absorption des bipyridines (308 nm), on observe un spectre d'émission typique des composés d'euporium, avec un temps de vie de l'état excité moyen de 1,1 ms (la décroissance n'est pas purement mono-exponentielle) et un rendement quantique de luminescence de 13%.

La caractérisation par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF (Matrice Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Fly = Ionisation par désorption sur matrice assistée par Laser, analyse par temps de vol) s'effectue de la manière
5 suivante. Une solution aqueuse d'ASB marquée est traitée à l'acide trifluoroacétique à 1% pour décomplexer l'euprécium, puis la protéine est adsorbée sur une colonne de chromatographie dont la phase solide hydrophobe est constituée de chaîne en C₄. Après lavage à l'eau, la protéine est
10 relarguée avec de l'acétonitrile, puis analysée par MALDI-TOF (matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique). La masse moyenne obtenue pour la protéine marquée sans euprécium est de 71700 Da (ASB, M = 66610 Da), conduisant à un rapport molaire marqueurs/BSA de 9/1 dans la protéine marquée.

15

Exemple 6

Préparation du complexe 8 de formule [Tb.(1-4H).H₂O]Na



Dans un ballon de 250 mL équipé d'un réfrigérant, 40 mg (59 μ mol) de composé 1.3HCl sont dissous dans un mélange de
20 30 mL de MeOH et de 30 mL d'eau. A cette solution sont ajoutés 25 mg (67 μ mol) de TbCl₃.6H₂O dissous dans 5 mL de MeOH et 5 mL d'eau. La solution est chauffée à 70°C pendant une heure. Après refroidissement, le pH de la solution est porté à 7,2 avec une solution à 1% de NaOH dans l'eau. La
25 solution est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à apparition d'un léger trouble, puis on ajoute du THF jusqu'à la formation d'un important précipité. Un solide jaune pâle

est isolé par centrifugation, puis séché sous vide. On obtient 46 mg (59 μmol) de complexe 8 (correspondant à un rendement quantitatif).

IR (pastille de KBr, cm^{-1}) : 3428, 1592, 1574, 1466, 1416, 1387.

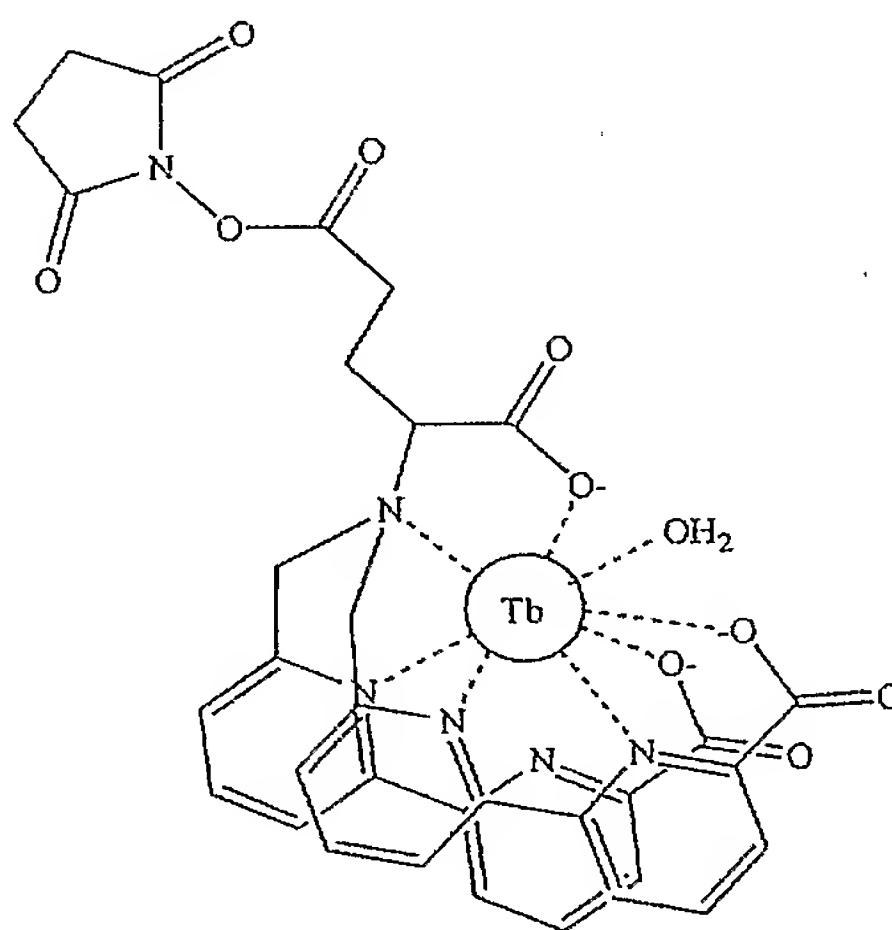
Propriétés photo-physiques dans l'eau:

Absorption, λ_{max} [nm] (ϵ_{max} [$\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$]) : 320 (épaulement), 308 (20800), 277 (8900), 267 (10400), 253 (15000).

Emission : caractéristique des composés du terbium avec des bandes fines à 487, 543, 583 et 621 nm. Temps de vie de l'état excité : 1,48 ms. Rendement quantique (référence sulfate de quinine dans H_2SO_4 1N) : 31%. Temps de vie de l'état excité dans l'eau lourde : 2,53 ms. Rendement quantique dans l'eau lourde : 53%.

Exemple 7

Préparation du complexe 9 de formule



Dans un ballon de 10 mL, 50 mg (65 μmol) de complexe 8 sont mis en suspension dans 5 mL de DMSO. A cette solution on ajoute 9 mg (78 μmol) de N-hydroxysuccinimide et 13 mg (68 μmol) de sels d'hydrochlorure d'éthyle-N,N-diméthyle-3-aminopropyle-carbodiimide (EDCI.HCl). La solution est agitée à température ambiante pendant 138 heures durant lesquelles le complexe 8 se dissout, puis un précipité blanc se forme. Le solide est isolé par centrifugation, lavé au THF et séché sous vide. L'addition de THF aux eaux-mères provoque la formation d'un précipité supplémentaire, que l'on récupère

par centrifugation. On obtient en tout 49 mg (59 μmol) de complexe 9 (correspondant à un rendement de 91%).

IR (pastille de KBr, cm^{-1}) : 3433, 1741, 1624, 1594, 1574, 1464, 1419, 1375.

5 Propriétés photo-physiques dans l'eau

Absorption, λ_{max} [nm] (ϵ_{max} [$\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$]) : 308 (18700), 276, 267, 253.

Emission : caractéristique des composés du terbium avec des bandes fines à 487, 543, 583 et 621 nm. Temps de vie de l'état excité : 1,50 ms. Rendement quantique (référence sulphate de quinine dans H_2SO_4 1N) : 34%. Temps de vie de l'état excité dans l'eau lourde : 2,42 ms. Rendement quantique dans l'eau lourde : 62%.

Exemple 8

15 Marquage de l'albumine sérique de bœuf ASB par le complexe 9
et mise en évidence par microscopie de luminescence en temps résolu.

Le marquage de l'albumine sérique de bœuf a été effectué selon la méthode décrite dans l'exemple 5 en
20 remplaçant le complexe 6 par le complexe 9.

Détermination du rapport molaire marqueurs/BSA

Le rapport molaire marqueurs/BSA (nombre de complexe 9 lié de façon covalente à l'ASB) est déterminé par absorption différentielle à 308 nm. Les coefficients d'absorption
25 molaire de l'ASB native et de l'ASB marquée sont mesurés à 308 nm. La différence de ces deux valeurs est divisée par le coefficient d'absorption molaire du complexe 9 à 308 nm, pour donner un rapport molaire marqueurs/BSA de 6/1 dans la protéine marquée.

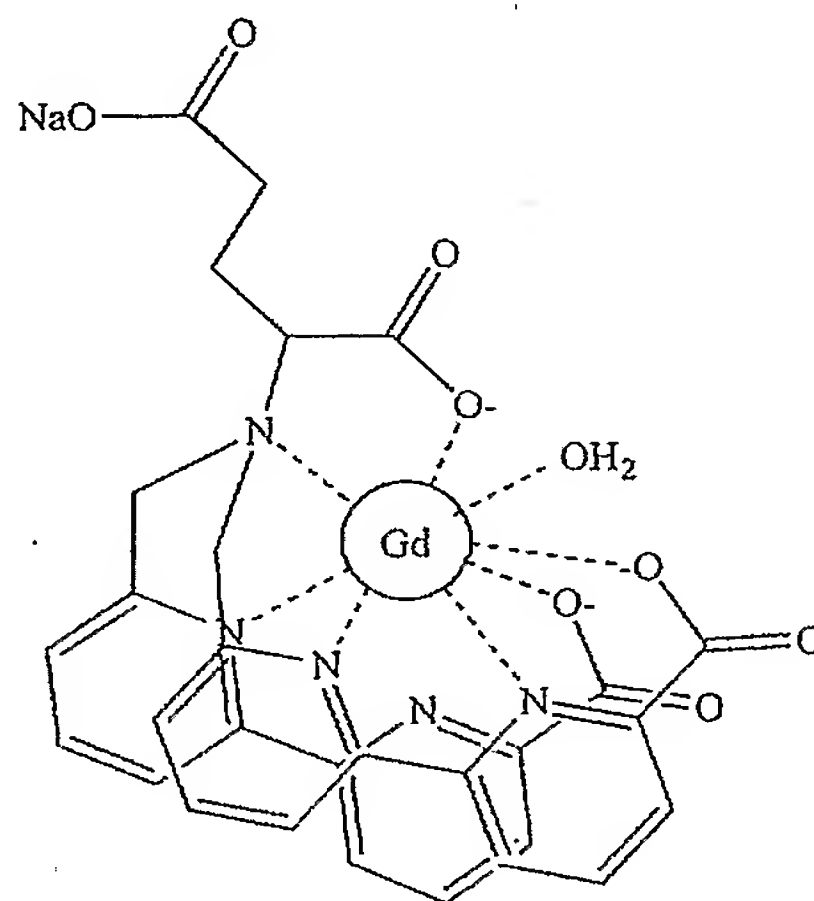
30 La figure 1 représente des gouttelettes d'environ 750 microns de diamètre contenant l'ASB marquée par le composé 9 (colonnes de gauche et de droite sur chaque image) et un anticorps marqué par de la fluorescéine (colonne du milieu sur chaque image) servant de référence (Immunoglobuline de
35 lapin marquée à la fluorescéine produit par Dako-Immunoglobuline sous le code produit F-123). L'image obtenue par microscopie de fluorescence conventionnelle (gauche) met en évidence la fluorescence des deux composés. L'image

obtenue par microscopie de luminescence en temps résolu (délai = 0,5 ms, temps d'intégration = 5,0 ms) montre la disparition de la fluorescence du composé de référence alors que la luminescence de l'ASB marquée perdure.

5

Exemple 9

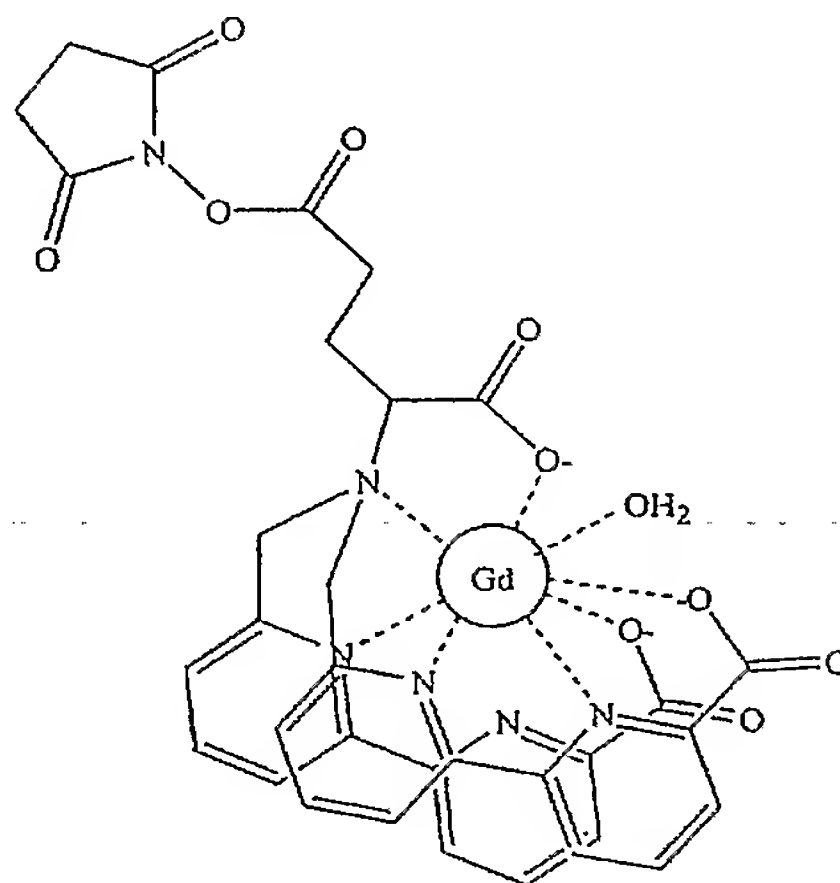
Préparation du complexe 10 de formule $[\text{Gd} \cdot (1-4\text{H}) \cdot \text{H}_2\text{O}] \text{Na}$



Dans un ballon de 100 mL équipé d'un réfrigérant, 30 mg (44 μmol) de composé 1.3HCl sont dissous dans un mélange de
10 25 mL de MeOH et de 25 mL d'eau. A cette solution on ajoute 19 mg (51 μmol) de $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 5 mL de MeOH et 5 mL d'eau. La solution est chauffée à 70°C pendant une heure. Après refroidissement le pH de la solution est remonté à 7,5 avec une solution à 0,5% de NaOH dans l'eau. La solution est
15 concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à apparition d'un léger trouble puis on ajoute du THF jusqu'à la formation d'un important précipité. Le solide jaune pâle est isolé par centrifugation puis séché sous vide pour donner 30 mg (39 μmol) de complexe 10 (correspondant à un rendement de 89%).
20 IR (pastille de KBr, cm^{-1}) : 3422, 1637, 1592, 1459, 1419, 1385.

Exemple 10

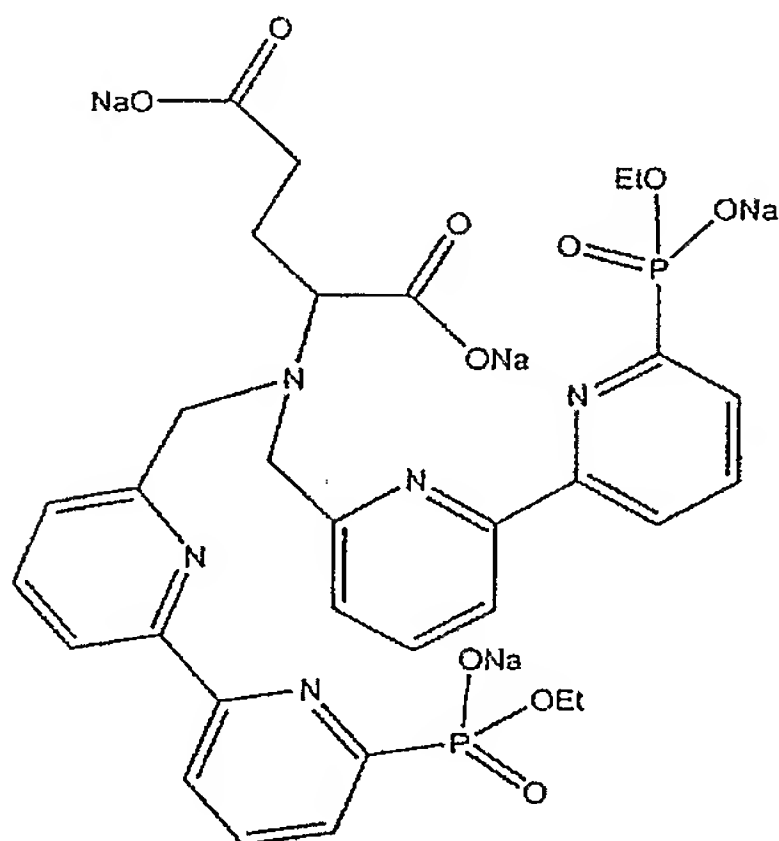
Préparation du composé 11 de formule



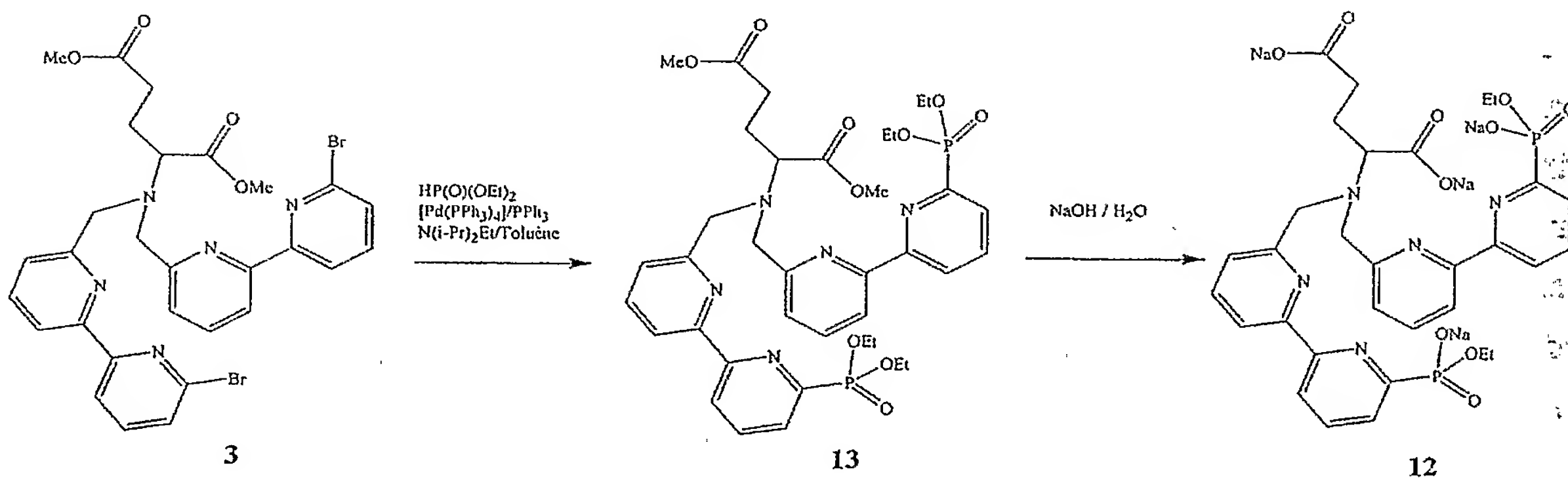
Dans un ballon de 10 mL, 50 mg (65 μmol) de composé 10
5 sont mis en suspension dans 5 mL de DMSO. A cette solution
on ajoute 9 mg (78 μmol) de N-hydroxysuccinimide et 15 mg
(78 μmol) de sels d'hydrochlorure d'éthyle-N,N-diméthyle-3-
aminopropyle-carbodiimide (EDCI.HCl). La solution est agitée
à température ambiante pendant 48 heures durant lesquelles
10 le complexe 10 se dissout, puis un précipité blanc se forme.
Le solide est isolé par centrifugation, lavé au THF et séché
sous vide. L'addition de THF aux eaux-mères provoque la
formation de précipité supplémentaire, que l'on récupère par
centrifugation. En tout, on obtient 45 mg (53 μmol) de
15 complexe 11 (correspondant à un rendement de 82%).
IR (pastille de KBr, cm^{-1}) : 3435, 1741, 1623, 1573, 1465,
1420, 1376.

Exemple 11

Préparation du composé 12



Ce composé est obtenu en deux étapes à partir du
5 composé **3** selon le schéma synthétique suivant :



Préparation du composé 13

Dans un tube de Schlenk sous atmosphère d'argon, on introduit 200 mg (0,30 mmol) de composé **3**, 90 μ L (0,70 mmol) de diéthylphosphite, 78 mg (0,30 mmol) de PPh_3 et 300 μ L de diisopropyléthylamine fraîchement distillée dans 10 mL de toluène. La solution est dégazée à l'argon pendant 20 minutes. On ajoute 34 mg (0,03 mmol) de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ et la solution est chauffée à 100°C pendant 16 heures. On ajoute 40 μ L (0,31 mmol) de diéthylphosphite et 34 mg (0,03 mmol) de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ et la solution est à nouveau chauffée à 100°C pendant 16 heures. La solution est évaporée à sec. Le résidu solide est purifié par chromatographie flash sur silice (ϕ =3 cm, h=15 cm) avec un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99/1 à 95/5) comme éluant. Les fractions pures sont évaporées,

solubilisées dans 30 mL de CH_2Cl_2 et lavées avec 10 mL d'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. On obtient 72 mg (0,09 mmol) de composé **13** (correspondant à un rendement de 31%) sous forme d'une huile
5 qui présente les caractéristiques suivantes :

$R_f = 0,56$, SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10).

^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) : δ 1,35 (t, 12H, $^3J=7,0$ Hz), 2,02-2,22 (m, 2H), 2,37-2,71 (m, 2H), 3,47 (s, 3H), 3,54-3,61 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 4,01-4,17 (m, 4H), 4,18-4,36 (m, 8H),
10 7,47 (d, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 7,73 (t, 2H, $^3J=8,0$ Hz), 7,81-7,97 (m, 4H), 8,32 (d, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 8,59 (dt, 2H, $^3J_{\text{H-H}}=7,0$ Hz, $^3J_{\text{H-P}}=^4J_{\text{H-H}}=2,0$ Hz).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 50 MHz) : δ 16,3, 16,4, 24,7, 30,3, 51,4, 57,1, 61,9, 63,0, 63,1, 119,6, 123,2 (2), 123,4, 127,4,
15 127,9, 136,7, 137,0, 137,2, 149,0, 153,5, 154,5, 156,5, 156,9, 159,0, 173,1, 173,4.

^{31}P -RMN (CDCl_3 , 162 MHz) : δ 11,73.

Préparation du composé **12**

Dans un ballon de 50 mL équipé d'un réfrigérant, 51 mg
20 (65 μmol) de composé **13** sont dissous dans 6 mL de solution de NaOH 0,05 N dans l'eau. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 19 heures. Après refroidissement la phase aqueuse est extraite avec 4 portions de 5 mL de CH_2Cl_2 puis évaporée à sec. Le produit précipite dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$. On
25 obtient 45 mg (57 μmol) de composé **12** (correspondant à un rendement de 88%) sous forme de poudre crème dont les caractéristiques sont les suivantes :

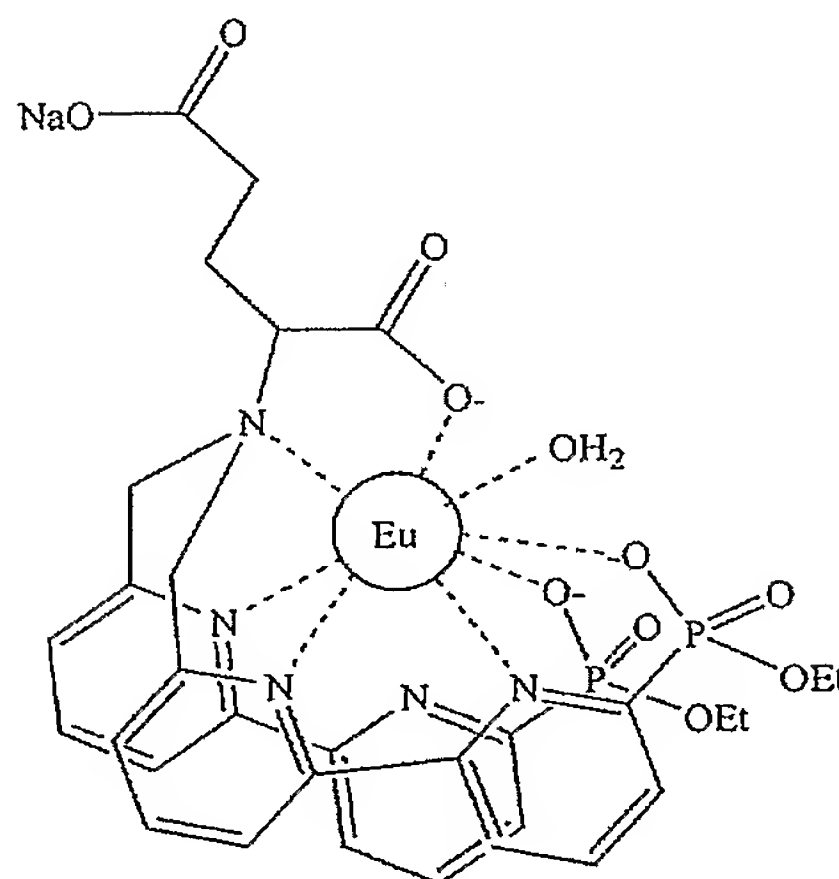
^1H -RMN ($\text{D}_2\text{O}/t\text{BuOH}$, 300 MHz) : δ 1,18 (t, 6H, $^3J=7,0$ Hz), 2,06-2,27 (m, 2H), 2,37-2,58 (m, 2H), 3,50 (t, 3H, $^3J=7,5$ Hz),
30 3,86-3,99 (m, 4H), 4,02-4,24 (m, 4H), 7,48 (d, 2H, $^3J=7,0$ Hz), 7,59-7,81 (m, 10H).

^{13}C -RMN ($\text{D}_2\text{O}/t\text{BuOH}$, 75 MHz) : δ 16,4, 16,5, 27,8, 35,6, 59,8, 62,4, 62,5, 71,6, 121,2, 124,0, 124,1, 125,7, 127,1, 127,4, 138,0, 138,2, 138,5, 154,6, 155,0, 156,3, 156,6, 157,8,
35 160,6, 181,1, 183,6.

^{31}P -RMN (D_2O , 162 MHz) : δ 10,17.

Exemple 12

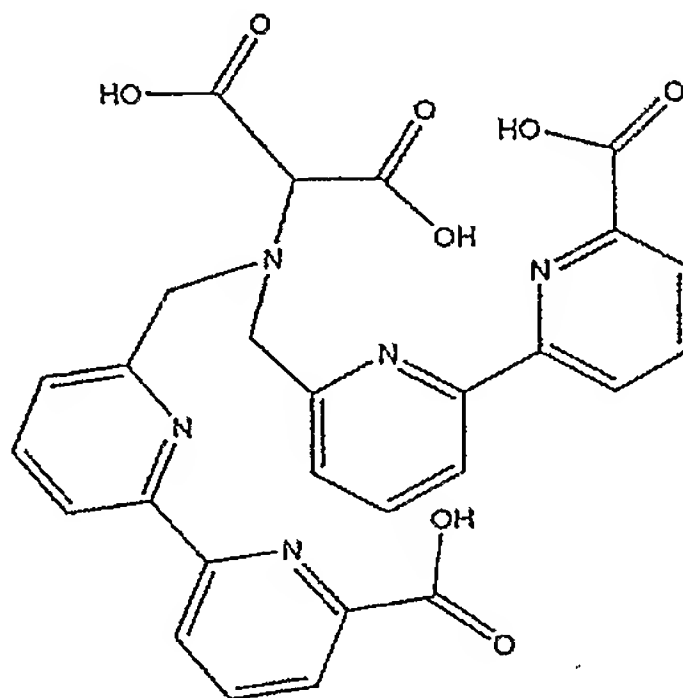
Préparation du complexe 14 de formule



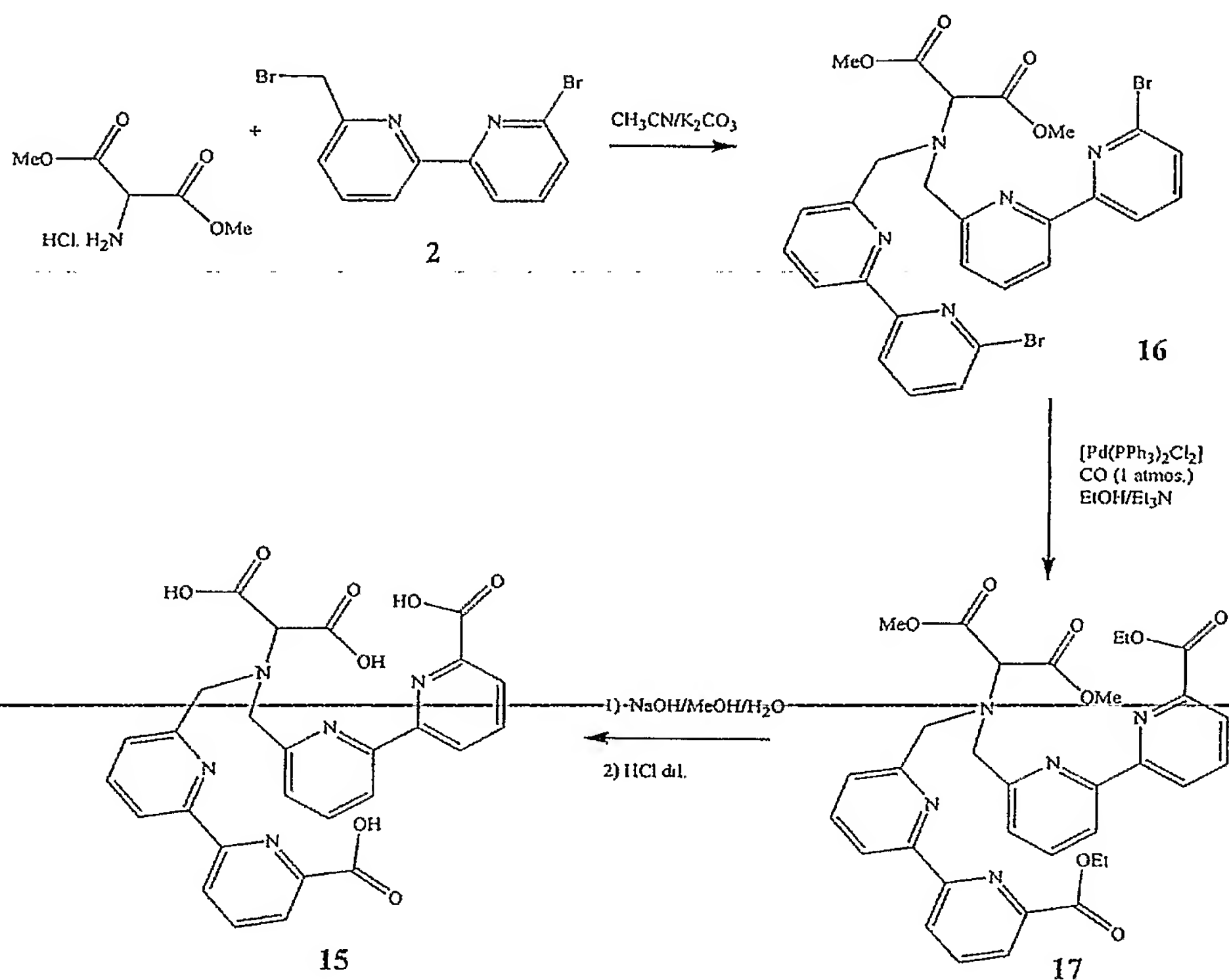
Dans un ballon de 50 mL équipé d'un réfrigérant, 19 mg
 5 (24 μmol) de composé **12** sont dissous dans 35 mL d'eau. Le pH
 est ajusté à 3,1 avec une solution de HCl dilué. A cette
 solution on ajoute 9 mg (25 μmol) de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dissous dans
 5 mL d'eau. La solution est chauffée à 80°C pendant une
 heure. Après refroidissement la solution est filtrée sur
 10 célite et le pH est remonté à 7,1 avec une solution à 0,5%
 de NaOH dans l'eau. La solution est évaporée à sec, le
 produit précipite dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$. Le solide jaune
 pâle est isolé par centrifugation puis séché sous vide, et
 l'on obtient 9 mg (10 μmol) de complexe **14** (correspondant à
 15 un rendement de 42%).

Exemple 13

Préparation du composé 15



Ce composé est obtenu en trois étapes selon le schéma synthétique suivant:



5 Préparation du composé 16

Dans un ballon de Schlenk de 500 mL sous atmosphère d'argon, on introduit 450 mg (2,13 mmol) de sels d'hydrochlorure de diéthylaminomalonate et 1,18 g (8,54 mmol) de K_2CO_3 dans 150 mL d'acétonitrile fraîchement distillée. La solution est chauffée à 80°C pendant une heure. On ajoute 1,46 g (4,45 mmol) de composé 2 et on chauffe pendant 21 heures à 80°C . La solution est évaporée à sec et le résidu est redissous avec 100 mL de CH_2Cl_2 et 20 mL d'eau. La phase aqueuse est lavée avec deux portions de 20 mL de CH_2Cl_2 et la somme des phases organiques est séchée sur MgSO_4 , filtrée, puis évaporée à sec. Le résidu solide est purifié par chromatographie flash sur silice ($\phi=4$ cm, $h=14$ cm) avec un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100/0 à 99/1) comme éluant. On obtient 794 mg (1,19 mmol) de composé 16 (correspondant à un rendement de 56%) sous forme de poudre jaune pâle qui présente les caractéristiques suivantes :

$R_f = 0,57$, SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97/3).

^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) : δ 1,26 (t, 6H, $^3J=7,0$ Hz), 4,22 (s, 4H), 4,23 (q, 4H, $^3J=7,0$ Hz), 4,47 (s, 1H), 7,43 (dd, 2H, $^3J=7,5$ Hz, $^4J=0,5$ Hz), 7,60 (t, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 7,62 (d, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 7,75 (t, 2H, $^3J=8,0$ Hz), 8,22 (dd, 2H, $^3J=7,5$ Hz, $^4J=1,0$ Hz), 8,37 (dd, 2H, $^3J=7,5$ Hz, $^4J=1,0$ Hz).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 50 MHz) : δ 14,1, 58,0, 61,4, 67,1, 119,7, 123,4, 127,7, 137,4, 139,0, 141,4, 153,5, 157,4, 158,9, 168,1.

Préparation du composé 17

10 Dans un ballon bicol de 250 mL on introduit 778 mg (1,16 mmol) de composé 16 et 82 mg (0,12 mmol) de $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$ dans 75 mL d'éthanol et 75 mL de triéthylamine. La solution est chauffée à 70°C pendant 16 heures en faisant barboter un flux de CO. La solution est

15 évaporée à sec, le solide obtenu est redissous dans 75 mL de CH_2Cl_2 , filtré sur célite, puis la phase organique est lavée avec 15 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite avec deux portions de 20 mL de CH_2Cl_2 et l'ensemble des phases organiques est séché sur MgSO_4 , filtré puis évaporé à sec.

20 Le résidu est purifié par chromatographie flash sur silice ($\phi=3$ cm, $h=16$ cm) avec un mélange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99,5/0,5 à 90/10) comme éluant. Les fractions contenant le composé 17 avec de l'oxyde de triphénylphosphine sont dissoutes dans 40 mL de CH_2Cl_2 et extraites avec quatre portions de HCl 3N. Les

25 phases aqueuses combinées sont neutralisées avec NaOH puis extraites avec trois portions de 30 mL de CH_2Cl_2 . L'ensemble des phases organiques est séché sur MgSO_4 , filtré puis évaporé à sec. On obtient 522 mg (0,80 mmol) de composé 17 sous forme d'une huile incolore (correspondant à un

30 rendement de 68%), qui présente les caractéristiques suivantes :

$R_f = 0,55$, SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10).

^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) : δ 1,26 (t, 6H, $^3J=7,0$ Hz), 1,45 (t, 6H, $^3J=7,0$ Hz), 4,23 (q, 4H, $^3J=7,0$ Hz), 4,24 (s, 4H), 4,47 (q, 4H, $^3J=7,0$ Hz), 4,48 (s, 1H), 7,64 (dd, 2H, $^3J=7,5$ Hz, $^4J=0,5$ Hz), 7,80 (t, 2H, $^3J=8,0$ Hz), 7,91 (t, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 8,09 (dd, 2H, $^3J=7,5$ Hz, $^4J=1,0$ Hz), 8,40 (dd, 2H, $^3J=7,5$ Hz, $^4J=0,5$ Hz), 8,62 (dd, 2H, $^3J=8,0$ Hz, $^4J=1,5$ Hz).

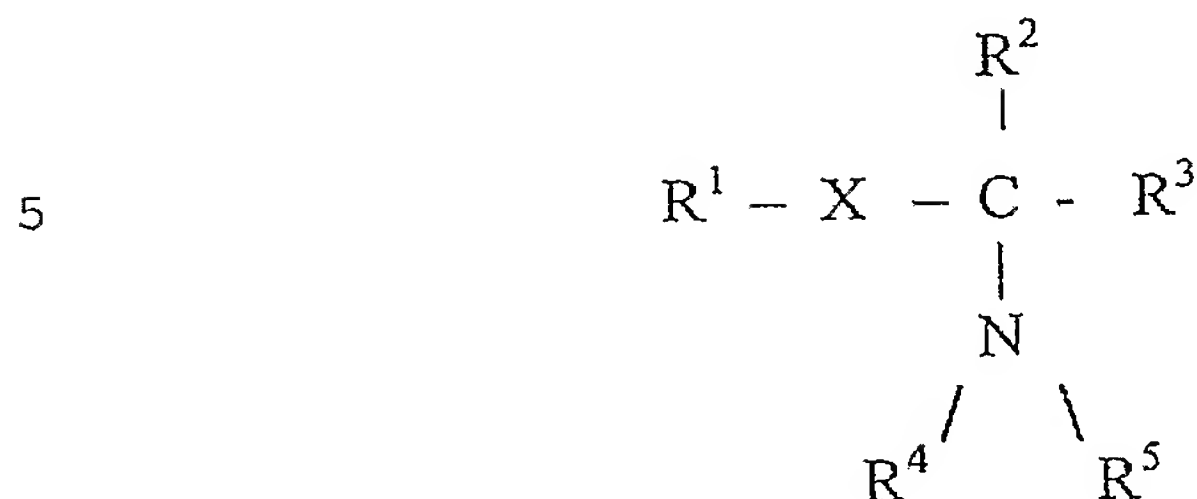
^{13}C -RMN (CDCl_3 , 50 MHz) : δ 14,1, 14,3, 58,0, 61,4, 61,8, 67,1, 120,0, 123,4, 124,2, 124,7, 137,5, 137,7, 147,7, 154,4, 156,5, 158,8, 165,3, 168,2.

Préparation du composé 15

5 Dans un ballon de 50 mL équipé d'un réfrigérant, 103 mg (0,16 mmol) de composé 17 et 50 mg (1,25 mmol) de NaOH sont dissous dans un mélange de 10 mL de MeOH et 5 mL d'eau. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 5 heures. La solution est évaporée à sec et le solide est dissous dans 8 mL d'eau sur
10 lesquels on ajoute lentement à 0°C une solution de HCl 1N jusqu'à ce que le produit précipite massivement (pH=4-5). Le précipité est isolé par centrifugation et séché sous vide. On obtient 59 mg (0,09 mmol) de sels d'hydrochlorure 15.3HCl (correspondant à un rendement de 58%) sous forme de poudre
15 blanche dont les caractéristiques sont les suivantes :
 ^1H -RMN ($\text{NaOD}/t\text{BuOH}$, 300 MHz) : δ 3,75 (s, 4H), 4,04 (s, 1H), 6,84 (d, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 7,15-7,26 (m, 4H), 7,32 (d, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 7,42 (t, 2H, $^3J=7,5$ Hz), 7,56 (d, 2H, $^3J=7,5$ Hz).
 ^{13}C -RMN ($\text{NaOD}/t\text{BuOH}$, 75 MHz) : δ 60,3, 79,4, 119,9, 122,9,
20 124,1, 124,4, 138,2, 138,6, 152,8, 153,7, 154,0, 158,7, 168,6, 172,3, 177,3.

Revendications.

1. Composé répondant à la formule (I)



10 dans laquelle

- R^1 est un groupe fonctionnel ;
- X représente une simple liaison ou une chaîne hydrocarbonée constituée par au moins un groupe choisi parmi les groupes alkylènes et les groupes alkénylènes qui
15 comprennent éventuellement au moins un hétéroatome, et parmi les groupes arylènes ;
- R^2 est un groupement anionique à pH neutre A^2 ou un groupe alkylène ou alkénylène ayant de 1 à 4 atomes de carbone et portant au moins un tel groupement A^2 , ledit
20 groupe alkylène ou alkénylène comprenant éventuellement au moins un hétéroatome dans la chaîne ;
- R^3 représente H ou un groupe alkylène ou alkénylène ayant de 1 à 5 atomes de carbone et contenant éventuellement au moins un hétéroatome dans la chaîne, ledit
25 groupe portant éventuellement au moins un groupement anionique à pH neutre A^3 ;
- R^4 est un substituant qui a des propriétés d'absorption de lumière et qui permet de former trois cycles chélates avec un lanthanide ;
- 30 - R^5 est un substituant qui permet de former trois cycles chélates avec un lanthanide.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est un groupe arylène qui comprend un noyau aromatique unique ou plusieurs noyaux aromatiques condensés
35 ou non, le(s)dit(s) noyau(x) portant éventuellement un ou plusieurs groupements hydrocarbonés aliphatiques.

3. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substituant R^1 est un groupe capable de réagir

avec les fonctions présentes sur les protéines, les anticorps ou sur des matériaux minéraux ou organiques.

4. Composé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le substituant R^1 est choisi parmi les groupes amino, thio, cyano, isocyano, acridine, hydrazino, halogénoacétate, anhydride, triazo, carbonyle, nitrobenzoyl, sulfonyl, thionyl, halogénure, époxyde, aldéhyde, imidazole, phénol, mercapto, succinimido, maléimido, hydroxyle, carboxyle, thiocyano et isothiocyano.

10 5. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le groupement X est un groupement alkylène ou alkénylène, ayant de 1 à 10 atomes de carbone.

6. Composé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le groupement X est groupement arylène ayant de 5 à 15 10 atomes de carbone.

7. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substituant R^2 est un groupe A^2 anionique à pH neutre.

8. Composé selon la revendication 1, caractérisé en 20 ce que le substituant R^3 est H ou un alkyle en C_1 à C_3 .

9. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substituant R^4 est un groupement répondant à la formule $-(C)_n-C-Z^1-C-C-Z^2-C-A^4$ dans laquelle n est égal à 1 ou 2, chaque Z^i représente un hétéroatome choisi parmi O et 25 N, l'un au moins des Z^i étant un atome d'azote qui fait partie d'un hétérocycle aromatique avec les deux atomes de carbone qui l'entourent, et A^4 est un groupe anionique à pH neutre tel que l'atome portant la charge anionique est en position γ par rapport à Z^2 .

30 10. Composé selon la revendication 9, caractérisé en ce que Z^1 et Z^2 font partie d'un groupe hétérocyclique aromatique.

11. Composé selon la revendication 9, caractérisé en ce que n est égal à 1.

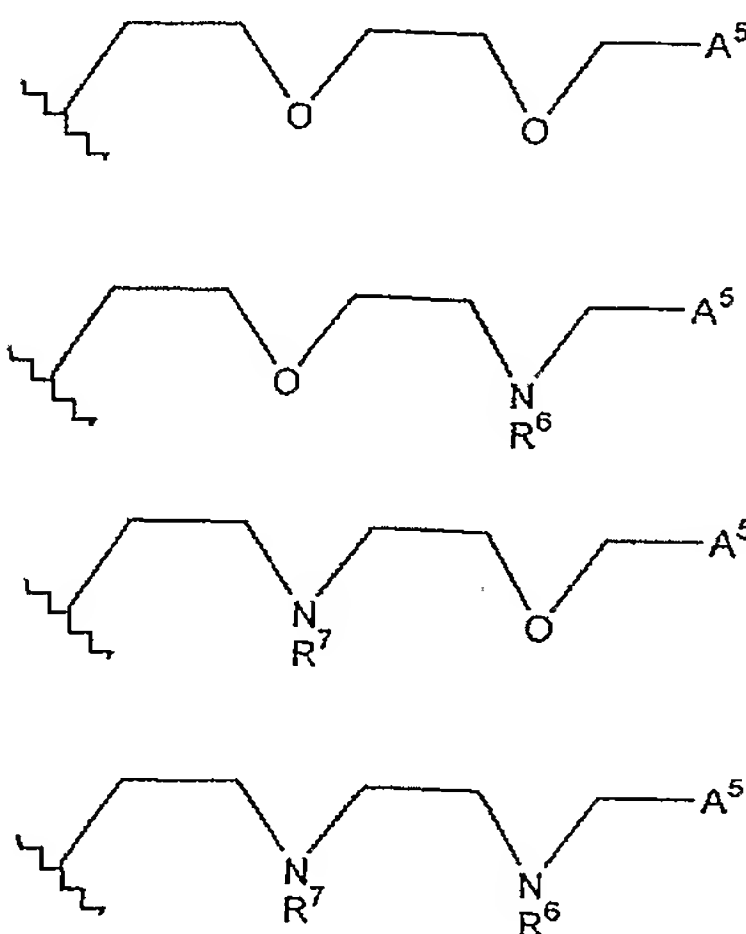
35 12. Composé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'un des segments $-C-Z^i-C-$ fait partie d'un groupe hétérocyclique choisi parmi les groupes pyridyle, pyrimidinyle, quinolyle et iso-quinolyle.

13. Composé selon la revendication 9, caractérisé en ce que chacun des segments $-C-Z^i-C-$ fait partie d'un groupe hétérocyclique choisi parmi les groupes pyridyle, pyrimidinyle, quinolyle et iso-quinolyle, les deux groupes hétérocycliques étant reliés au moins par les deux atomes de carbone séparant Z^1 et Z^2 .

14. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substituant R^5 est choisi parmi :

- les groupements définis pour R^4 ;
- 10 - les chaînes hydrocarbonées $-C-C-E^1-C-C-E^2-C-A^5$ dans lesquelles E^1 et E^2 représentent indépendamment l'un de l'autre un hétéroatome choisi parmi O et N, et A^5 est un groupe anionique à pH neutre tel que l'atome portant la charge anionique est en position γ par rapport à E^2 .

15 15. Composé selon la revendication 14, caractérisé en ce que R^4 est choisi parmi les groupements suivants :



dans lesquels R^6 et R^7 représentent des chaînes alkyles ayant de préférence de 1 à 5 atomes de carbone et contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes.

16. Composé selon la revendication 9, caractérisé en ce que R^4 et R^5 sont identiques.

17. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que les groupes anioniques à pH neutre A^2 , A^3 , A^4 ou A^5 sont choisis indépendamment les uns des autres parmi les groupes $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-P(O)(OR)OH$ et $-P(O)(OH)_2$ dans lesquels R est un groupe alkyle (de

préférence en C₁ à C₃) ou un groupe aryle (de préférence en C₅ à C₉).

18. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est sous forme cationique, l'azote porteur des substituants R⁴ et R⁵, ainsi qu'éventuellement les hétéroatomes Z¹, Z², E¹ et E² se trouvant sous forme protonée.

19. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est sous forme anionique, les différents groupes Aⁱ se présentant sous forme de sel.

20. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est sous forme zwitterionique.

21. Procédé de préparation d'un complexe de lanthanide, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un composé (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 avec un composé donneur de cation lanthanide.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le composé donneur de cation lanthanide est choisi parmi les halogénures de lanthanide hydratés, les nitrates de lanthanide hydratés, les carbonates de lanthanide et les triflates de lanthanide.

23. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que la réaction est effectuée en solution dans un solvant choisi parmi l'eau, le méthanol, l'éthanol ou l'acétonitrile.

24. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on fait réagir le composé (I) avec le précurseur de l'ion lanthanide dans un mélange de méthanol et d'eau à un pH allant de 3 à 5, pendant une durée comprise entre 10 minutes et 24 heures, à une température comprise entre 25°C à 80°C, puis l'on ajuste le pH de la solution à 7,0 et on évapore le méthanol.

25. Complexe obtenu par un procédé selon la revendication 21, constitué par un ion lanthanide Ln complexé par un ligand qui répond à la formule (I).

26. Complexe selon la revendication 25, caractérisé en ce que l'ion lanthanide est choisi parmi les ions europium,

terbium, samarium, dysprosium, erbium, ytterbium, néodyme et gadolinium.

27. Complexe selon la revendication 25, caractérisé en ce que le substituant R^4 du composé (I) est
5 $-C-C-Z^1-C-C-Z^2-C-A^4$, les 3 cycles chélates se formant entre le cation lanthanide et respectivement :

- l'atome N portant R^4 et R^5 , Z^1 et les atomes de carbone qui les séparent ;
- Z^1 , Z^2 et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- 10 - le segment terminal Z^2-C-A^4 .

28. Complexe selon la revendication 27, caractérisé en ce que le substituant R^5 est du même type que le substituant R^4 .

29. Complexe selon la revendication 27, caractérisé en
15 ce que le substituant R^5 est du type $-C-C-E^1-C-C-E^2-C-A^5$, 3 cycles chélates à 5 membres se formant entre le cation lanthanide et respectivement :

- l'atome N portant R^4 et R^5 , E^1 et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- 20 - E^1 , E^2 et les deux atomes de carbone qui les séparent ;
- le segment terminal E^2-C-A^5 .

30. Procédé pour l'analyse quantitative ou qualitative d'un composé, caractérisé en ce qu'il consiste à lier de manière covalente audit composé, un marqueur constitué par
25 un complexe selon l'une des revendications 25 à 29, et à détecter ou quantifier la présence du composé marqué grâce aux propriétés de luminescence du marqueur.

31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le complexe est un complexe d'euprimum, de terbium,
30 de samarium ou de dysprosium.

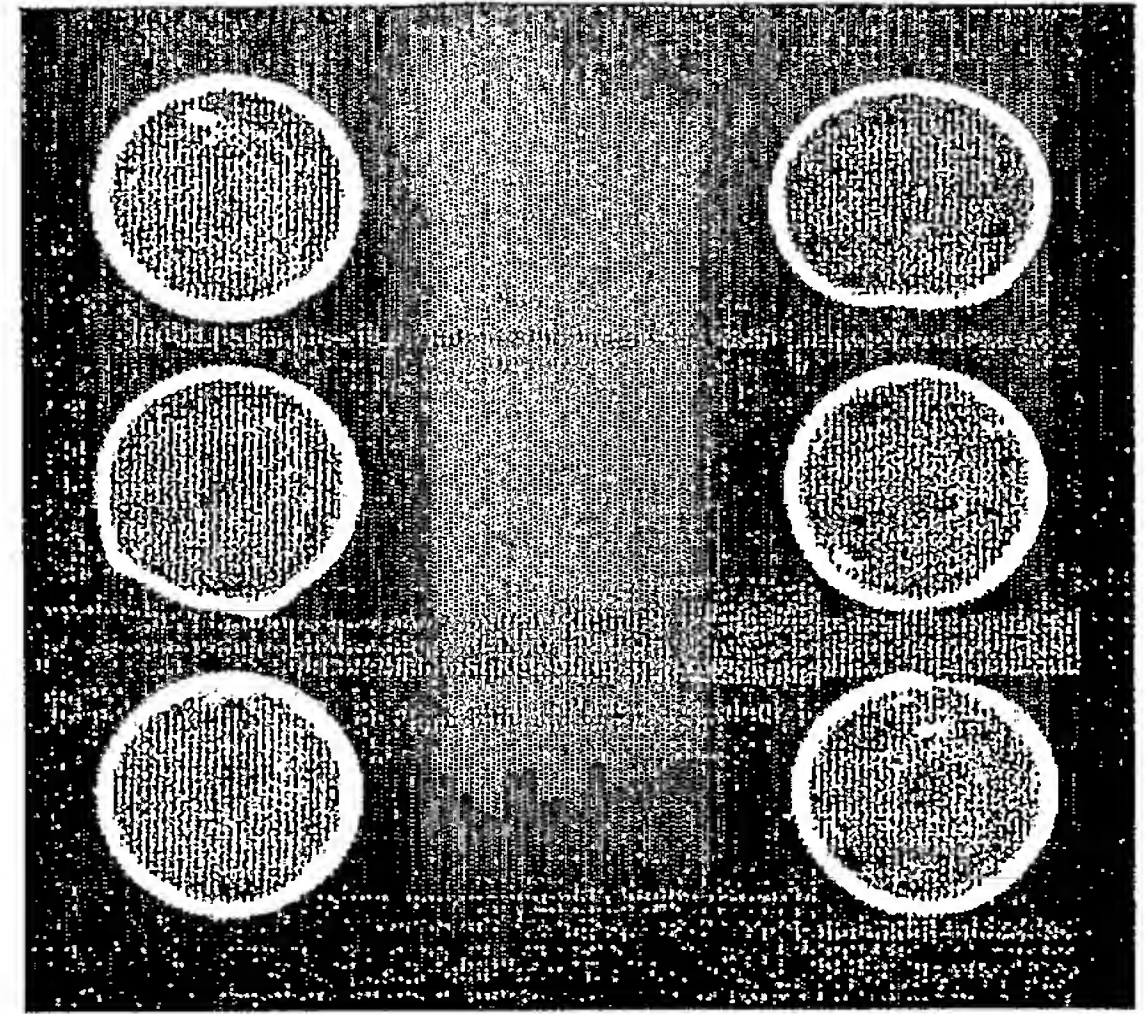
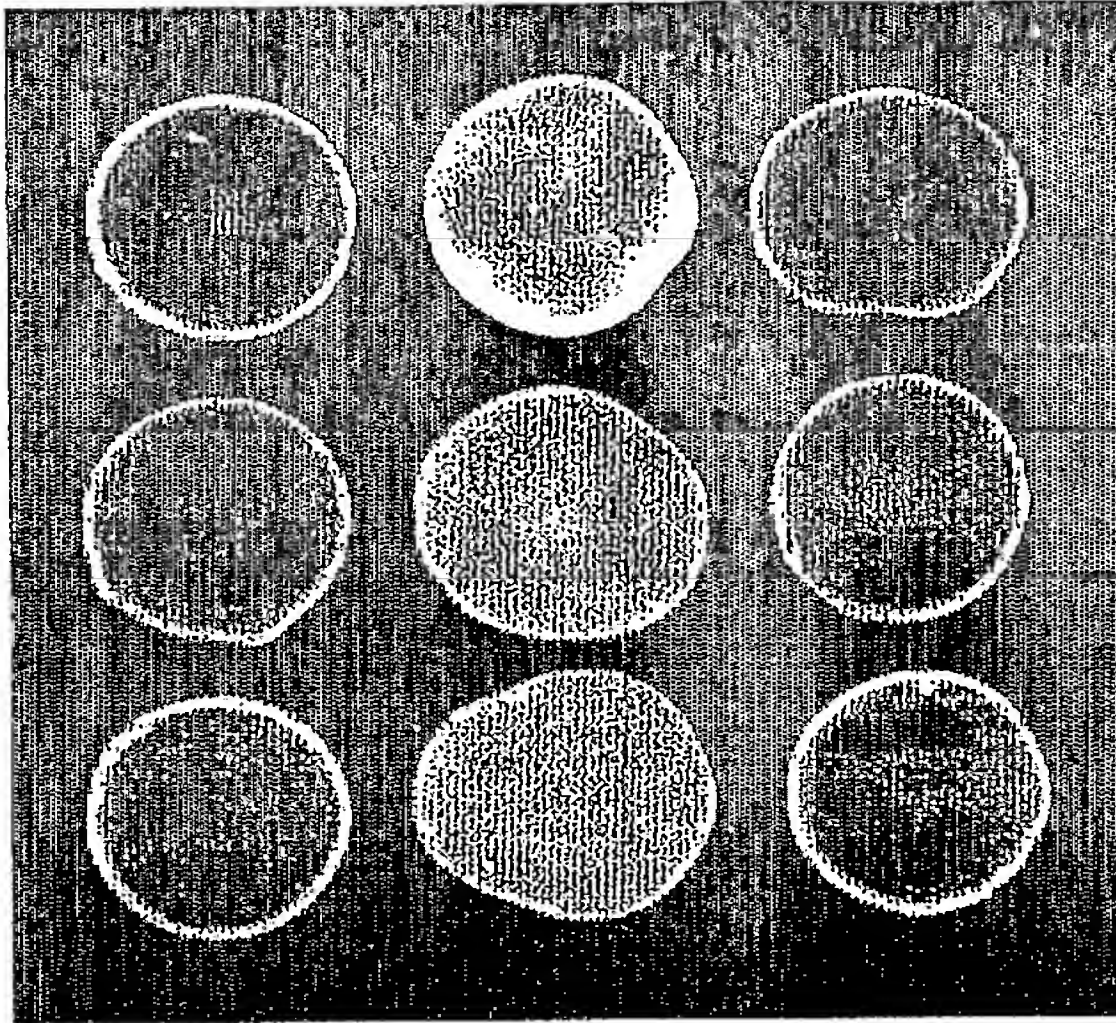
32. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le substituant R^1 du complexe est choisi parmi les groupes amino, thio et carboxyle ou parmi les groupes maléimido, succinimido et isothiocyano.

33. Agent de relaxation pour la résonance magnétique nucléaire, constitué par un complexe selon l'une des revendications 25 à 29.

34. Agent de relaxation selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il est constitué par un complexe de gadolinium, d'euporium ou de dysprosium.

35. Agent de relaxation selon la revendication 33, 5 caractérisé en ce qu'il est constitué par un complexe dans lequel le substituant R^1 est choisi parmi les groupes amino, thio et carboxyle ou parmi les groupes maléimido, succinimido et isothiocyano.

Fig. 1



reçue le 08/09/03



BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11 235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0557FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0309158	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Complexes de lanthanide, leur préparation et leurs utilisations.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CHARBONNIERE	
Prénoms		Loïc	
Adresse	Rue	1, Impasse des Tulipes	
	Code postal et ville	67720	WEYERSHEIM
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		ZIESSEL	
Prénoms		Raymond	
Adresse	Rue	3, rue des Cailles	
	Code postal et ville	67400	SOUFFELWEYSHEIM
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		WEIBEL	
Prénoms		Nicolas	
Adresse	Rue	11, rue Messimy	
	Code postal et ville	68000	COLMAR
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Yvette SUEUR CPI 92-1232 Le 02/09/2003			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0557FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0309158	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Complexes de lanthanide, leur préparation et leurs utilisations.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		RODA	
Prénoms		Aldo	
Adresse	Rue	via Saragozza 18	
	Code postal et ville	40123	BOLOGNA - ITALIE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		GUARDIGLI	
Prénoms		Massimo	
Adresse	Rue	via Sauro Babini 98	
	Code postal et ville	48010	RONCALCECI - (RA) - ITALIE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Yvette SUEUR CPI 92-1232 Le 02/09/2003			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

FR 04 1921

